

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA I**



**TESIS DOCTORAL**

**Nanotubos de carbono marcados magnéticamente como  
agentes de contraste para imagen por resonancia magnética**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA  
PRESENTADA POR**

**Viviana Negri**

Directores

Paloma Ballesteros García  
Sebastián Cerdán García-Esteller

**Madrid, 2015**



Departamento de Química Orgánica I  
Facultad de Ciencias Químicas  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**Nanotubos de Carbono Marcados Magnéticamente  
como Agentes de Contraste para Imagen  
por Resonancia Magnética**

**TESIS DOCTORAL**

**VIVIANA NEGRI**

**Madrid, 2015**







Departamento de Química Orgánica I  
Facultad de Ciencias Químicas  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**Nanotubos de Carbono Marcados Magnéticamente  
como Agentes de Contraste para Imagen  
por Resonancia Magnética**

**VIVIANA NEGRI**

**Licenciada en Ciencias Químicas**

**Directores**

**Prof. Paloma Ballesteros García**

**Prof. Sebastián Cerdán García-Esteller**





**Dña. PALOMA BALLESTEROS GARCÍA**, Catedrática de Química Orgánica en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Estudios a Distancia (UNED)

**D. SEBASTIÁN CERDAN GARCÍA-ESTELLER**, Profesor de Investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

**CERTIFICAN:** Que el trabajo realizado en la siguiente memoria titulada “Nanotubos de Carbono Marcados Magnéticamente como Agentes de Contraste para Imagen por Resonancia Magnética”, ha sido realizado por **Dña. Viviana Negri** en la Unidad Asociada al CSIC “Grupo de Síntesis Orgánica e Imagen Molecular por Resonancia Magnética”, localizada en el Laboratorio de Síntesis Orgánica e Imagen Molecular por Resonancia Magnética de la Facultad de Ciencias de la UNED y en el Laboratorio de Imagen y Espectroscopia por Resonancia Magnética del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” del CSIC, autorizando su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Madrid a 17 de abril de 2015.

Fdo: Paloma Ballesteros García

Fdo: Sebastián Cerdán García-Esteller





Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en la Unidad Asociada UNED-CSIC “Grupo de Síntesis Orgánica e Imagen Molecular por Resonancia Magnética” adscrita al Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” del CSIC bajo la dirección de los Profesores Paloma Ballesteros García y Sebastián Cerdan García-Esteller dentro del marco de los proyectos: I2M2-Lab.250 S2010/BMD-2349; MICINN CTQ2010-20960-C02-01 (BQU); MICINN CTQ2009-14146-C02-01 (BQU); CM- S-BIO/0170/2006; Integrated Project NMP4-CT-2006-02668.

La autora agradece la financiación otorgada por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas a través de un contrato predoctoral del Programa “Junta de Ampliación de Estudios” que ha hecho posible la realización de este trabajo.

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis se recogen en las siguientes publicaciones:

**- “Magnetoliposomes Loaded with Poly-Unsaturated Fatty Acids as Novel Theranostic Anti-Inflammatory Formulations”**

D. Calle; V. Negri; P. Ballesteros; S. Cerdán. *Theranostics*, **2015**, 5 (5), 489-503

**- Single-walled carbon nanotubes as anisotropic relaxation probes for magnetic resonance imaging.**

A. Cerpa; M. Koeber; D. Calle; V. Negri; J. M. Gavira; A. Hernanz; S. Cerdan; F. Briones; P. Ballesteros. *Medicinal Chemistry Communications* - **2013**, 4, (4), 669 - 672.

- **Environmentally Sensitive Paramagnetic and Diamagnetic Contrast Agents for Nuclear Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy**  
Pacheco-Torres, J.; Calle, D.; Lizarbe, B.; Negri, V.; Ubide, C.; Fayos, R.; Lopez Larrubia, P.; Ballesteros, P.; Cerdan, S. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2011**, *11*(1), 115-130.

- **Nanotubular Paramagnetic Probes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging Based on the Diffusion Tensor**

Negri, V.; Cerpa, A.; Lopez-Larrubia, P.; Nieto-Charques, L.; Cerdan, S.; Ballesteros, P.

*Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, *49*(10), 1813-1815.

- **Chemistry of Paramagnetic and Diamagnetic Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. pH Responsive Contrast Agents.**

E. Perez-Mayoral; V. Negri; J. Soler-Padrós; S. Cerdán; P. Ballesteros.

*European Journal Of Radiology*. **2008**, *67*, 453 - 458.

- **Paramagnetic Complexes as Contrast Agents Based on Heterocyclic Systems and their Biomedical Applications.**

E. Perez-Mayoral; J. Soler-Padrós; V. Negri; S. Cerdán; P. Ballesteros.

*Molecules*. **2007** , *12*, 1771 - 1795.

Los resultados obtenidos han producido las siguientes patentes:

-**Compuestos y composiciones que comprenden nanotubos de carbono y compuestos de formula (I) y su uso como agentes de contraste**

P. Ballesteros García; V. Negri; D. Calle Hernandez

P 201400058, 2014

- **Materiales nanoestructurados tubulares con propiedades magnéticas anisotrópicas, procedimiento de obtención y sus aplicaciones**

Cerdán, S.; Lopez-Larrubia, P.; Nieto Charques, L.; Ballesteros, P.; Pérez-Mayoral, E.; Negri, V.

P200800024, 2008. WO2009/087253 A1

*A mi marido Miguel Ángel  
y a mis hijos María y Matteo*





*L'esperienza più bella e profonda  
che un uomo possa avere è il senso del mistero,  
è il principio sottostante alla religiosità  
così come tutti i tentativi seri nell'arte e nella scienza.  
Chi non ha mai avuto quest'esperienza  
mi sembra che sia, se non morto, allora almeno cieco  
e sentire che dietro a qualsiasi cosa che può essere  
sperimentata  
c'è qualcosa che la nostra mente non può cogliere del tutto  
e la cui bellezza e sublimità ci raggiunge solo indirettamente,  
come un debole riflesso.*

*Albert Einstein*



## Agradecimientos

Por fin ha llegado ese deseado momento y no niego que me da vértigo escribir estas palabras porque me permiten tomar conciencia de todo lo que he vivido y de lo que han sido estos años.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de Tesis: a la Profesora Paloma Ballesteros y al Profesor Sebastián Cerdán.

Paloma: gracias por haberme acogido en tu laboratorio, por haber confiado en mí, por haberme empujado, aconsejado, asesorado, por la valentía que tienes, por haber puesto todos los medios posibles para que la investigación pudiese llevarse a cabo de la mejor forma. Quiero agradecerte todas las oportunidades científicas y didácticas que me has ofrecido, como la oportunidad de ser monitora de prácticas en la asignatura de Síntesis Orgánica. Gracias porque eres un ejemplo por cómo has luchado por llevar a cabo tu investigación, por seguir adelante manteniendo los laboratorios con unas condiciones alrededor más que adversas.

Sebastián: quiero agradecerte tus fundamentales aportaciones científicas, tus ideas, tu disponibilidad y amabilidad. Es una gran ayuda tener a un director que trabaja con tanta pasión y quiere tanto a la ciencia. Gracias por haberme acogido todas las veces que lo he necesitado en tu laboratorio en el Instituto de Investigaciones Biomédicas. Sebastián y Paloma gracias por haberme permitido participar a muchos congresos y por haber luchado para que tuviese siempre financiación.

Quiero agradecer al Departamento de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, por brindarme la oportunidad de poder defender esta Tesis Doctoral, valorando el trabajo de todos estos años.

Vorrei ringraziare il Dr Roberto Pagliarin, la Professoressa Fulvia Orsini e tutta l' Unità 002 del Dipartimento di Chimica Organica e Industriale dell'Università degli Studi di Milano per avermi accolta per tre mesi nei loro laboratori dove ho potuto realizzare parte della sintesi raccolta in questa Tesi di Dottorato. Grazie Roberto: lavorare con te è sempre un piacere e una gioia infinita, mi fai riscoprire l'amore e la passione per la chimica organica al quale mi introducesti durante la Tesi di Laurea, sei un Maestro.

Ringrazio il Professor Silvio Aime del Molecular Biotechnology Center dell'Università degli Studi di Torino e tutto il suo gruppo per avermi accolto nei suoi laboratori dove è stata realizzata tutta la caratterizzazione rilassometrica riportata in questa tesi. Vorrei menzionare la Dottoressa Eliana Gianolio per i preziosi consigli sui complessi, Giuseppe Ferrauto per i paper sull'Evans e soprattutto la Dottoressa Simona Baroni, che ha realizzato tutta la caratterizzazione rilassometrica, dedicando moltissimo tempo, molto più del previsto, sia di laboratorio che di analisi dei dati e correzione delle varie versioni del capitolo sulla rilassività. Simona, ti sono davvero grata per la tua disponibilità e professionalità. Lavorare anche solo una settimana nel vostro gruppo è stata un'esperienza davvero gratificante, perchè da voi si "respira scienza", grazie!

Quiero agradecer de forma muy especial el Dr Daniel Calle Hernández por la caracterización magnética (SQUID, pruebas magneto-ópticas) de los nanotubos de carbono. Dani gracias por hacerme entender toda la física que está detrás de mi tesis, por ayudarme y enseñarme a analizar los datos de resonancia, por el tiempo pasado juntos al TEM y por el que me has dedicado. ¡GRACIAS!

Quiero agradecer a las Profesoras Arisbel Cerpa, Isabel Lado y Piedad Ros de la Universidad Europea de Madrid por la importante contribución a mi Tesis Doctoral. Arisbel: gracias por haber seguido con la oxidación de los SWCNTs durante mi baja maternal y por todo lo que ha surgido de allí, ¡por la energía que tienes! Isabel: gracias por la modelización molecular, sin tu investigación al respecto mi tesis estaría "coja". ¡Me encanta trabajar contigo, eres una persona súper eficaz! Piedad: gracias por haberme introducido en el mundo de la Fluorescencia, tu ayuda ha sido fundamental para este aspecto de mi Tesis, ¡he aprendido muchísimo de ti!

Llegamos a la UNED, al "sótano", a los laboratorios S13 y S14, ¡el azul y el verde como los llama Paloma! Han sido el lugar donde he realizado la mayoría del trabajo de la Tesis, mi casa vamos. No quiero dejar de agradecer a todas las personas con las que he tenido la oportunidad de trabajar a lo largo de estos años porque de una forma u de otra han contribuido a mi formación. Me remonto a los comienzos: Jordi, el estudio

contigo, María, Elena y Manuel. Elena Mesa y ¡su inventario! Hubo un antes y un después en el laboratorio. Alberto: el año contigo ha sido una pasada, he disfrutado muchísimo trabajando y confrontándome contigo sobre la síntesis. Geno, la persona más manitas que he conocido en mi vida, gracias por cómo te preocupas para que en el labo esté siempre todo bien. Carmen: mi compañera favorita, hemos estado juntas todos estos años, gracias por haber estado, ¡siempre! Quiero agradecer a María José Rodríguez por haber sido la primera estudiante a la que he codirigido su proyecto de fin de grado, ¡por su bondad y ganas de trabajar bien! También quiero agradecer a Ángel, Aitor, Jesús y María Soria. Quiero agradecer a los profesores Enrique Teso y Amelia García por haberme dado la oportunidad de ser monitora de prácticas de la asignatura de Análisis Orgánico. No quiero olvidarme de M<sup>a</sup> Ángeles, por la ayuda en resolver las dudas de química analítica, descanse en paz. Agradezco al Profesor Ernesto Martínez García por preguntarme siempre como iba mi tesis. Finalmente quiero agradecer a los Decanos de la Facultad de Ciencias de la UNED Víctor Fairen y Antonio Zapardiel por su colaboración.

Llegamos a “Biomédicas”: el laboratorio del Profesor Sebastián Cerdan, donde siempre me he sentido como en casa. Hay algunas personas que han sido fundamentales en mi tesis y de las cuales no quiero olvidarme: Patri, siempre te he dicho que me sorprendía tu amabilidad y tu disponibilidad. ¡Gracias por la ayuda en la realización de los ensayos de toxicidad! Jesús: ¡gracias por todos los consejos que me has dado! Laura: todo empezó contigo, el procesamiento de las imágenes y la programación de MyMapAnalyzer, ¡muchas gracias! Gracias a Tiago, Blanca, Alex, Edu, María y Ania: eres una persona muy discreta y especial. Valeria, non abbiamo coinciso per molto tempo però tra noi due c'è stata subito una buona intesa! Quiero agradecer a la Doctora Pilar Lopez-Larrubia por todos los consejos de Imagen por Resonancia Magnética y por ser como eres, ¡gracias Pili! Y a Rocío, ¡porque eres muy *salá*! Quiero agradecer al Servicio de Resonancia Magnética SIERMAC, a Tere y María por todos los experimentos de Imagen por Resonancia Magnética, ¡muchísimas gracias

por vuestra ayuda! Al Servicio de Imagen Científica: Javi si esta tesis es gráficamente bonita ¡tú tienes el mérito!

Quiero dar las gracias a las personas que me han acompañado a lo largo de estos años y han sido fundamentales para que llegase hasta aquí.

Todos los amigos de mi Frater: ¡me habéis sostenido muchísimo! Nacho que entiende lo que hago, es muy listo y ¡me pregunta! ¡Caro, Cris, Antonio, la conversación contigo sobre la investigación me ayudó muchísimo! Miriam Mac, Ángel y Leo: vuestra compañía ha sido fundamental a lo largo de estos años y es fundamental en el día a día, gracias por ayudarme siempre a mirar lo Esencial. Leo quiero aprender a mirar la realidad y a vivir como has vivido tú. María José: gracias por estar siempre que lo he necesitado y por ayudarme a no mirar mi ombligo y a volver a empezar. Gracias a Sol, Richi, Laura y Juan Car. Grazie Luci perchè la tua amicizia in questi anni è continuata a essere un pilastro della mia vita!! Dani, Giorgia e famiglia per avermi ospitata in casa vostra durante la mia permanenza a Torino. Grazie ai miei amici Valtellinesi!! Gracias a mi familia española, mi suegra Jose, mis cuñados Marisa, Migue, Amparo y Justo y mis sobrinitos por cuidar de mis hijos y dejarme un puente entero para seguir con la escritura de la tesis. Grazie ai miei zii Irma e Sergio che durante il periodo di permanenza in Italia hanno curato Maria mentre io lavoravo a Milano!! Ringrazio anche le mie cugine e rispettivi mariti!! Grazie a mamma e papà che nella distanza mi avete appoggiata e sostenuta sempre e avete curato i bimbi molte volte!! Michi perchè ci sei e punto!!

Ahora llegan las personas más importantes de mi vida: mis niños María y Matteo que han trabajado conmigo en la tesis durante los embarazos. Gracias por enseñarme que no se puede apartar la realidad y por quererme, ¡para hacerme sentir la mejor! Quiero dar las gracias a mi marido Miguel Ángel por la ayuda con la estadística y el análisis de datos. Lechu gracias por qué no me has ahorrado ninguna fatiga, me has desafiado siempre y no has bajado nunca el “tiro”, eres un verdadero compañero del camino de la vida, ¡gracias por cómo me quieres!

Finalmente quiero dar las gracias a Dios por darme la realidad para que la pueda conocer y por darme una compañía donde yo pueda vivir.

## Índice

---





## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>I</b>
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VI
NOTAS SOBRE LA PUNTUACIÓN	VI
NOTAS SOBRE LAS REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	IX
NOTAS SOBRE LA NOMENCLATURA Y LA NUMERACIÓN DE LAS MOLÉCULAS	X
<b>ABSTRACT</b>	<b>I</b>
MAGNETICALLY LABELLED CARBON NANOTUBES AS CONTRAST AGENTS FOR MAGNETIC RESONANCE IMAGING	III
INTRODUCTION	III
BACKGROUND	III
OBJECTIVES	VI
RESULTS AND DISCUSSION	VI
Molecular modelling	VI
SWCNTs-Single-walled carbon nanotubes	VII
MWCNTs- Multi-Walled Carbon Nanotubes	VIII
Synthesis of pyrene derivative ligands with DOTA mono amide (DOTAma) Gd(III) complexes	IX
MWCNTs and DOTAma derivatives $\pi$ - $\pi$ adducts	X
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. INTRODUCCIÓN	3
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>14</b>
2.1. INTRODUCCIÓN A LA IMAGEN POR RESONANCIA MAGNÉTICA	17
2.2. AGENTES DE CONTRASTE PARA MRI	20
2.2.1. Características generales de los ACs paramagnéticos	21
2.2.2. Clasificación de los ACs	22
2.2.3. Teoría de la relajatividad (Solomon-Bløembergen-Morgan)	24
2.2.4. Agentes de Contraste Paramagnéticos	28
2.2.4.1. Complejos de metales paramagnéticos	29
2.2.5. Agentes de contraste de segunda generación. Imagen Molecular	35
2.3. DIFUSIÓN DEL AGUA EN IMAGEN POR RESONANCIA MAGNÉTICA	37
2.3.1. Imagen del Tensor de Difusión: Difusión anisotrópica	41
2.4. NANOTUBOS DE CARBONO	44
2.4.1. Métodos de producción de nanotubos de carbono	46
2.4.1.1. Método del Catalizador Flotante	46

2.4.1.2. Ablación Láser	47
2.4.1.3. Descarga de arco	47
2.4.1.4. Deposición química de vapor (CVD)	48
2.4.2. Propiedades y características	48
2.4.3. Purificación	50
2.4.4. Funcionalización	51
2.4.4.1. Funcionalización covalente	52
2.4.4.2. Funcionalización no covalente	55
2.4.5. Aplicaciones	58
2.4.6. Toxicidad	61
2.5. FLUORESCENCIA DE PIRENO	63
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>69</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL	71
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	71
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>73</b>
4.1. MODELIZACIÓN MOLECULAR	75
4.1.1. Modelización molecular de interacciones $\pi$ - $\pi$ entre nanotubos de carbono y diferentes moléculas aromáticas: benceno, pireno, aminopireno y nitropireno.	75
4.1.1.1. Resultados Obtenidos	75
4.1.2. Cálculo de coeficientes de difusión mediante dinámica molecular	83
4.1.2.1. Métodos “all-atoms”	83
4.1.2.2. Métodos “Coarse Grained”	87
4.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CNTS DE LONGITUD CONTROLADA	96
4.2.1. Nanotubos de Carbono de Pared Sencilla (SWCNTs)	96
4.2.1.1. SWCNTs: Preparación y Caracterización	96
4.2.1.2. SWCNTs: Anisotropía Magnética en el Coeficiente de Difusión Aparente	105
4.2.1.3. SWCNTs: Citotoxicidad	107
4.2.2. Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple (MWCNTs)	109
4.2.2.1. MWCNTs: Preparación y caracterización	109
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	110
Espectroscopia Foelectrónica de Rayos X (TXRF)	112
Análisis Termogravimétrico (TGA)	112
4.3. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ADUCTOS POR INTERACCIONES $\pi$ - $\pi$ ENTRE CNTS, AMINO (AP) Y NITRO PIRENO (NP)	115
4.3.1. Formación aductos	115
4.3.2. Caracterización físico-química de los aductos	116
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	116

Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF) .....	117
Análisis Termogravimétrico (TGA) .....	117
Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS) .....	118
4.3.2.2. Espectros de emisión de fluorescencia de aminopireno (AP) a diferentes pH y del aducto AP-MWCNTs .....	119
4.3.2.3. Espectroscopia Infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR con ATR) .....	124
4.3.2.4. MWCNTs: Propiedades magnéto-ópticas .....	126
4.4. SÍNTESIS DE LIGANDOS DERIVADOS DE PIRENO CON COMPLEJOS DE Gd(III) BASADOS EN DOTA MONO AMIDA (DOTAMA) .....	136
4.4.2. Derivados con un complejo de Gd(III) y con espaciadores diferentes entre pireno y tetraazamacrociclo .....	139
4.4.2.1. Gd(III) DOTAmEtilendiaminaPireno (21) .....	139
4.4.2.2. Gd(III) DOTAmPegPireno (22) .....	144
4.4.3. Derivados con un complejo de Gd(III) y un anillo aromático unido al pireno .....	150
4.4.3.1. Compuesto derivado del acoplamiento de Suzuki .....	151
4.4.3.2. Alquilación del derivado de Suzuki y DOTAmEtilendiamina .....	159
4.4.3.3. Derivado de DOTAmPegNH <sub>2</sub> (47) .....	160
4.4.3.4. Alquilación entre el derivado de Suzuki y el derivado de DOTAmPegNH <sub>2</sub> .....	162
4.4.4. Derivados con dos complejos de Gd(III) .....	163
4.4.4.1. Derivado de bispropilentríamina .....	163
Grupo protector: trifluoroacetamidas .....	164
Grupo Protector: Boc .....	165
4.4.4.2. Derivado de TREN ( <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>1</sup> -bis(2-aminoetil)etan-1,2-diamina) .....	170
4.5. FORMACIÓN ADUCTOS POR INTERACCIONES $\pi$ - $\pi$ .....	173
4.5.1. Aductos por interacciones $\pi$ - $\pi$ entre MWCNTsCOOH y DOTAmEtilendiaminaPireno .....	173
4.5.2. Aductos por interacciones $\pi$ - $\pi$ entre MWCNTs-US y DOTAmPegPireno .....	176
4.6. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS LIGANDOS, COMPLEJOS Y ADUCTOS OBTENIDOS .....	180
4.6.1. Fluorescencia .....	180
4.6.1.1. Fluorescencia DOTAmEtilendiaminaPireno .....	181
4.6.1.2. Fluorescencia DOTAmPegPireno .....	184
4.6.1.3. Comparación aducto 80 y 82. ....	186
4.6.2. Relassività dei complessi di Gd(III) e degli addotti ottenuti ...	188

4.6.2.1. Determinazione della concentrazione della specie paramagnetica .....	192
Metodo rilassometrico: digestione con HCl 6N .....	192
Metodo Evans .....	193
Metodo spettrofotometrico UV-visibile .....	193
4.6.2.2. Complessi di Gd (III) .....	194
4.6.2.3. Nanotubi di Carbonio (MWCNTs) e addotti diamagnetici.....	198
MWCNTsCOOH e addotto 81 .....	199
MWCNTs-US e addotto 83 .....	202
Paragone MWCNTsCOOH e MWCNTs-US.....	204
4.6.2.4. Addotti paramagnetici tra complessi di Gd(III) e MWCNTs. ....	208
Addotto Gd(III)DOTAmaEtilendiamminaPirene 80.....	209
Addotto Gd(III)DOTAmaPegPirene 82 .....	212
Paragone tra gli addotti 80 e 82 .....	217
4.6.3. Imagen por Resonancia Magnética .....	221
4.6.3.1. Mapas de T <sub>1</sub> y de T <sub>2</sub> .....	221
4.6.3.2. Mapas de coeficiente de Difusión Aparente (ADC).....	224
Mapa de ADC del Agua .....	226
Mapas de ADC del aducto AP-MWCNTs (16).....	226
Mapas de ADC de los complejos de Gd(III) 21 y 22b y del complejo de La(III) 45. ....	227
Mapas de ADC de los aductos 80, 82 y 83 .....	229
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>233</b>
<b>6. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>241</b>
6.1. GENERAL .....	243
6.1.1. Disolventes y reactivos .....	243
6.2. EQUIPOS EMPLEADOS EN LA CARACTERIZACIÓN.....	243
6.3. MODELIZACIÓN MOLECULAR .....	248
6.3.1. Modelización molecular de interacciones $\pi$ - $\pi$ entre nanotubos de carbono y diferentes moléculas aromáticas: benceno, pireno, aminopireno y nitropireno. ....	248
6.3.1.1. Métodos teóricos.....	248
6.3.2. CÁLCULO DE COEFICIENTE DE DIFUSIÓN MEDIANTE DINÁMICA MOLECULAR.....	249
6.3.2.1. Método “all-atoms” .....	249
6.3.2.2. Método “Coarse- Grained” .....	249
6.4. PURIFICACIÓN Y FRAGMENTACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO (CNTS) DE PARED SIMPLE (SWCNTS) Y MULTIPLE (MWCNTS).....	251
6.4.1. SWCNTs.....	251

Procedimiento A: SWNTs-A .....	251
Procedimiento B: SWNTsGd(III)-B .....	251
Procedimiento C: SWNTsCOOH-C .....	252
Procedimiento D: SWNTsCOOHGd(III)-D .....	252
SWCNTs: procedimiento E: SWCNTsCOOH .....	253
6.4.2. MWCNTs.....	254
MWCNTs-US.....	255
MWCNTsCOOH .....	255
6.5. FORMACIÓN DE ADUCTOS POR INTERACCIONES $\pi$ - $\pi$ ENTRE CNTs AP Y NP .....	257
$\pi$ - $\pi$ MWCNTsCOOH-AminoPireno (16).....	257
$\pi$ - $\pi$ MWCNTsCOOH-NitroPireno (18) .....	258
6.6. SÍNTESIS DE LOS LIGANDOS Y COMPLEJOS .....	259
6.6.1. Derivados de DOTA mono amida.....	259
1,4,7-tris( <i>terc</i> -butoxicarbonilmetil)-1,4,7-tetraazaciclododecano (27) .....	259
Hidrólisis 1,4,7-tris( <i>terc</i> -butoxicarbonilmetil)-1,4,7- tetraazaciclododecano.....	260
4,7-Bis-( <i>terc</i> -butoxicarbonilmetil)-10-metoxycarbonilmetil-1,4,7,10- tetraaza-ciclododecan-1-il)acetato de <i>terc</i> -butilo (28).....	261
(4-[(2-Aminoetilcarbamoil)metil]-7,10-bis- <i>terc</i> -butoxicarbonilmetil- 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il)-2-acetato de <i>terc</i> -butilo (25) .....	262
Hidrólisis (4-[(2-aminoetilcarbamoil)metil]-7,10-bis- <i>terc</i> - butoxicarbonilmetil-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il)-2- acetato de <i>terc</i> -butilo.....	262
2,2',2''-(10-(2-((2-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1- il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano- 1,4,7-triil)triacetato de tri- <i>terc</i> -butilo (58).....	263
(3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil)carbamato de <i>terc</i> - butilo (36).....	264
Intento de obtención de (1-bromo-2-oxo-7,10,13-trioxa-3- azahexadecan-16-il)carbamato de <i>terc</i> -butilo.....	265
Método: Dipea y ACN .....	265
(1-bromo-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azahexadecan-16-il)carbamato de <i>terc</i> -butilo (60) .....	265
Método: K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> y ACN .....	265
2,2',2''-(10-(2,2-dimetil-4,20-dioxo-3,9,12,15-tetraoxa-5,19- diazaoenicosan-21-il)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7- triil)triacetato de tri- <i>terc</i> -butilo (61) .....	266

2,2',2''-(10-(16-amino-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azaexadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de tri- <i>terc</i> -butilo (47) .....	267
6.6.2. Derivados de aminopireno .....	268
2-bromo- <i>N</i> -(piren-1-il)acetamida (84) .....	268
Intento de obtención de: 2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-((2-oxo-2-(piren-1-ilamino)etil)amino)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de tri- <i>terc</i> -butilo .....	269
Intento de obtención de 2,2',2''-(10-(2,19-dioxo-19-(piren-1-ilamino)-7,10,13-trioxa-3,17-diazanonadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de tri- <i>terc</i> -butilo .....	270
Intento de obtención de: 2,2',2''-(10-(2-((2-((3,4-dioxo-2-(piren-1-ilamino)ciclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato tri- <i>terc</i> -butilo .....	270
6.6.3. Derivados de ácido pirenilbutírico .....	271
2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de tri- <i>terc</i> -butilo. (31) .....	271
Método: cloruro de oxalilo .....	271
Intento de obtención de: Ácido 2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacético (32) .....	272
Método: ácido trifluoroacético .....	272
2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de tri- <i>terc</i> -butilo (31) .....	272
Ácido 2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacético (32) .....	274
2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de Gd (III) (21) .....	275
2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de La (III) (33) .....	276
Intento de obtención de 2,2',2''-(10-(2,18-dioxo-21-(piren-1-il)-7,10,13-trioxa-3,17-diazaenicosil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacetato de tri- <i>terc</i> -butilo (40).....	277
(15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)carbamato de <i>terc</i> -butilo (37).....	278
Método: cloruro de oxalilo .....	278
Método: ácido pirenilbutírico <i>N</i> -hidroxisuccinimida. ....	280

N-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida (38).....	280
N-(1-bromo-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azaexadecan-16-il)-4-(piren-1-il)butanamida (39).....	282
2,2',2''-(10-(2,18-dioxo-21-(piren-1-il)-7,10,13-trioxa-3,17-diazaenicosil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacetato de tri- <i>terc</i> -butilo (40) .....	283
Ácido 2,2',2''-(10-(2,18-dioxo-21-(piren-1-il)-7,10,13-trioxa-3,17-diazaenicosil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacético (41) .....	284
2,2',2''-(10-(2,18-dioxo-21-(piren-1-il)-7,10,13-trioxa-3,17-diazaenicosil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacétato de Gd (III) (22) .....	285
N-(3-(2-(2-(3-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propoxi)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida (42) .....	286
2,2',2''-(10-(2-((2-((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecane-1,4,7-tri-il)triacetato de tri- <i>terc</i> -butilo (43) .....	287
Ácido 2,2',2''-(10-(2-((2-((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacético (44) .....	288
2,2',2''-(10-(2-((2-((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecane-1,4,7-tri-il)triacetato de Gd (III) (22b)' .....	289
2,2',2''-(10-(2-((2-((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecane-1,4,7-tri-il)triacetato de La (III) (45) .....	290
6.6.4. Derivados de acoplamiento de Suzuki.....	292
Intento de obtención de Ácido 4-(piren-1-il) benzoico.....	292
Intento de obtención de 4-(piren-1-il)anilina(52) .....	292
Método: Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , EtOH/Tol .....	292
2-cloro-N-(4-(piren-1-il)fenil)acetamida (85) .....	293
Intento de obtención de 4-(piren-1-il)anilina (52) .....	294
Método: Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; iPrOH/H <sub>2</sub> O.....	294
Intento obtención N-(4-bromofenil)acetamida (53) .....	294
Intento obtención N-(4-bromofenil)acetamida (53) .....	294
N-(4-bromofenil)acetamida (53)' .....	295



Intento de obtención de <i>N</i> -(4-(piren-1-il)fenil)acetamida.....	295
4,4,5,5-tetrametil-2-(piren-1-il)-1,3,2-dioxaborolano (54) .....	296
Intento de obtención de 4-(piren-1-il)anilina (52) .....	297
Intento de obtención de 4-(piren-1-il) anilina con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	297
3-((4-bromofenil)amino)-4-etoxiciclobut-3-ene-1,2-diona (55) ...	298
Intento de obtención de 3-etoxi-4-((4-(piren-1-il)fenil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona .....	299
Método: NaOH .....	299
Método: Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	299
3,4-dihidroxiiciclobut-3-ene-1,2-diona.....	300
Intento de obtención de <i>N</i> -(4-(piren-1-il)fenil)acetamida.....	300
1-(4-nitrofenil)pireno (57) .....	301
Intento de obtención de 4-(piren-1-il)anilina .....	302
4-(piren-1-il)anilina (52) .....	302
3-etoxi-4-((4-(piren-1-il)fenil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (46)	303
2,2',2''-(10-(16-((3,4-dioxo-2-((4-(piren-1-il)fenil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azaexadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacetato de tri- <i>terc</i> -butilo (48)	305
Intento de obtención de ácido 2,2',2''-(10-(16-((3,4-dioxo-2-((4-(piren-1-il)fenil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azahexadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacetico (62) .....	306
6.6.5. Derivados de bispropilentríamina .....	307
<i>N,N'</i> -(azandiilbis(propan-3,1-diil))bis	
(2,2,2-trifluoroacetamida) (64) .....	307
<i>N</i> -(3-(2-cloro- <i>N</i> -(3-(2,2,2-trifluoroacetamida)propil)acetamida)propil)-2,2,2-trifluoroacetamida (65).....	307
Intento de obtención de (azandiilbis(propan-3,1-diil))dicarbamato de di- <i>terc</i> -butilo (69).....	308
Método: dicarbonato de di- <i>terc</i> -butilo y DIPEA .....	308
Método: carbonil diimidazol y <i>terc</i> -butanol.....	309
Método: <i>terc</i> -butanol/H <sub>2</sub> O y NaOH.....	309
(Azandiilbis(propan-3,1-diil))dicarbamato de di- <i>terc</i> -butilo (69) .	309
((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)azandiil)bis(propan-3,1-diil))dicarbamato de di- <i>terc</i> -butilo (70) .....	310
((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaooctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)azandiil)bis(propan-3,1-diil))dicarbamato de di- <i>terc</i> -butilo (71) .....	311
<i>N</i> -(3-(2-(3-((2-(bis(3-aminopropil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propoxi)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida (72) .....	312

<i>N,N'</i> ((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)azanedil)bis(propan-3,1-diil))bis(2-bromoacetamida) (73).....	314
Intento de obtención de triacetato <i>de N,N'</i> ((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)azanedil)bis(propan-3,1-diil))bis(2- tri- <i>terc</i> -butil 2,2',2''-(1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil) acetamida)	
acetato de <i>terc</i> -butilo .....	315
<i>N</i> -(3-(2-(2-(3-((2-(bis(3-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propoxi)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida (74).....	315
Intento de obtención de bispropilentriamina di DOTA (75) .....	317
6.6.6. Derivados de Tren .....	319
4,4',4''-((nitrilotris(etan-2,1-diil))tris(azadiil))tris(3-etoxiciclobut-3-ene-1,2-diona) (77) .....	319
<i>N</i> -(3-(2-(2-(3-((2-((2-(bis(2-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)etil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propoxi)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il) butanamida (78) .....	320
DiDOTAmonoPegPirenoTREN (79) .....	321
6.7. FORMACIÓN DE ADUCTOS POR INTERACCIONES $\pi$ - $\pi$ ENTRE MWCNTS COMPLEJOS DE LA (III) Y GD(III).....	323
Aducto $\pi$ - $\pi$ MWCNTsCOOH Gd(III)DOTAmaEtilendiaminaPireno (80) .....	323
Aducto $\pi$ - $\pi$ MWCNTs-fragmentados La(III) DOTAETilendiaminaPireno (81) .....	324
Aducto $\pi$ - $\pi$ MWCNTs-US Gd(III)DOTAPegPireno (82) .....	324
Aducto $\pi$ - $\pi$ MWCNTs-US La(III)DOTAPegPireno (83).....	326
6.8. CARACTERIZACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO Y ADUCTOS.....	327
6.8.1. Análisis termogravimétrico .....	327
6.8.2. Dispositivo superconductor de interferencia cuántica.....	327
6.8.3. Experimentos de Imagen por Resonancia Magnética .....	327
6.8.3.1. MWCNTs .....	328
6.8.4. Citotoxicidad .....	328
6.8.4.1. SWCNTsCOOH. ....	328
6.8.5. Experimentos de fluorescencia.....	329

ANEXO I: PUBLICACIONES .....

ANEXO II: PATENTES .....



# ÍNDICE DE FIGURAS

## 1. INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Sistema de navegación natural del salmón. ....	3
Figura 1.2. Propiedades magnéticas de las nanopartículas.....	4
Figura 1.3. Nanopartículas multifuncionales de contraste para imagen molecular y potencial mecanismo de acción a nivel celular.....	9
Figura 1.4. Plataformas nanotecnológicas utilizadas en bioimagen. ....	10

## 2. ANTECEDENTES

Figura 2.1. MRI de un meningioma antes (A) y después (B) de la administración de un AC.....	24
Figura 2.2. Representación de un complejo de Gd(III) con una molécula de agua en su primera esfera de coordinación en disolución acuosa.....	27
Figura 2.3. Ligandos acíclicos y ligandos macrocíclicos. ....	31
Figura 2.4. Ligandos monoméricos heterocíclicos complejantes de Gd(III). ....	33
Figura 2.5. Complexonas con estructura de bi y bis-pirazol. ....	33
Figura 2.6. Ligandos de DTPA y DOTA con estructura pirazólica. ....	34
Figura 2.7. Difusión del agua en medio libre de obstrucciones (A) y en tejidos (B). ....	38
Figura 2.8. Secuencia spin-eco de imagen potenciada en difusión .....	39
Figura 2.9. Determinación de ADC a partir de imágenes potenciadas en difusión obtenidas con valores crecientes de b. ....	40
Figura 2.10. Principios de la difusión anisotrópica del agua en el cerebro humano.....	42
Figura 2.11. Formas alotrópicas de carbono .....	44
Figura 2.12. Nanotubos de carbono: SWCNTs y MWCNTs. ....	45
Figura 2.13. Tipos de nanotubos según el plegamiento. ....	46
Figura 2.14. Esquema del proceso de descarga de arco en la producción de los CNTs. ....	47
Figura 2.15. Imagen TEM de un ovillo de SWCNTs. ....	50
Figura 2.16. Funcionalización de nanotubos de carbono en la superficie	53
Figura 2.17. Ejemplos de funcionalización no covalente de CNTs. ....	56
Figura 2.18. Espectro de emisión de fluorescencia de pireno en H <sub>2</sub> O, con sus bandas características .....	63
Figura 2.19. Dependencia del disolvente en las bandas vibrónicas en los espectros de emisión de fluorescencia de pireno monómero. ....	64
Figura 2.20. Fluorescencia de pireno en forma de monómero y excímero en función de la concentración en disolvente apolar. ....	65
Figura 2.21. Espectro de emisión del pireno en forma de monómero y excímero en metanol [–], agua [---], agua/NaOH [---] y [---] NMP.....	65
Figura 2.22. Energía potencial de dos moléculas de pireno en función de la distancia intermolecular. ....	67

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 4.1. Configuración paralela .....	76
Figura 4.2. Configuración paralela desplazada.....	76
Figura 4.3. Configuración perpendicular .....	77
Figura 4.4. Superficie de densidad electrónica para la molécula 7. ....	80
Figura 4.5. Configuraciones paralela (34), paralela desplazada (35) y perpendiculares (36-8) para nitropireno.....	81
Figura 4.6 A. Modelo utilizado en cálculos de coeficientes de difusión de agua: un nanotubo .....	83
Figura 4.6 B. Modelo utilizado en cálculos de coeficientes de difusión de agua: dos nanotubos .....	83
Figura 4.7. Desplazamiento cuadrático medio de todas las moléculas de agua del sistema (dentro y fuera del nanotubo) para un CNT sin funcionalizar. ....	84
Figura 4.8. Desplazamiento cuadrático medio de las moléculas de agua dentro de un CNT sin funcionalizar.....	85
Figura 4.9. Desplazamiento cuadrático medio de las moléculas de agua total y agua dentro del CNT funcionalizado con dos moléculas de aminopireno. ....	86
Figura 4.10. Modelos “coarse-grained” utilizados para representar el agua y los nanotubos.....	87
Figura 4.11. Modelo utilizados en las simulaciones “coarse-grained”: ejemplo de celda con un nanotubo. ....	88
Figura 4.12. Modelo utilizado en las simulaciones “coarse-grained”: celda con dos nanotubos.....	90
Figura 4.13. Desplazamiento cuadrático medio de las moléculas de agua total (panel superior) y agua interna (panel inferior) de dos CNTs.....	92
Figura 4.14. Modelo utilizado en las simulaciones “all-atoms” .....	93
Figura 4.15. MSD frente al tiempo de agua interna para un sistema conteniendo un CNT (10.0).....	94
Figura 4.16. Imágenes representativas TEM, a 100 kV de A) SWCNTs comerciales, B) SWCNTs purificados con HCl conc., C) SWCNTsGd(III) y D) SWCNTsCOOH.. ....	98
Figura 4.17. Espectros infrarrojos (ATR) de A) SWCNTs, B) SWCNTs- Gd(III), C) SWCNTsCOOH y, D) SWCNTsCOOH-Gd(III). ....	99
Figura 4.18. Perfiles termogravimétricos de SWCNTs, SWCNTs-Gd(III), SWCNTsCOOH y SWCNTsCOOH-Gd(III). El calentamiento se realiza en presencia de aire sintético. ....	99
Figura 4.19. Perfiles de XPS de SWCNTs, SWCNTsGd(III), SWCNTsCOOH y, finalmente, SWCNTsCOOH-Gd(III). ....	100

Figura 4.20. Perfiles de TXRF de preparaciones representativas de A) SWCNTs, B) SWCNTs-Gd(III), C) SWCNTsCOOH y, D) SWCNTsCOOH-Gd(III).	100
Figura 4.21. Propiedades fisicoquímicas de SWCNTsCOOH 24 horas.	101
Figura 4.22. Caracterización de SWCNTs comerciales y oxidados durante 24 y 48 horas.	103
Figura 4.23. Ciclos de histéresis y curvas vírgenes de geles de agarosa conteniendo A: SWCNTs comerciales, B: oxidados 24 y C: 48 horas. D: variación de la anisotropía magnética con el tiempo de oxidación.	104
Figura 4.24. Mapas ortogonales del ADC del agua en una suspensión de SWCNTsCOOH.	106
Figura 4.25. Ensayos MTT (A, C) y LDH (B, D) de citotoxicidad en células C6 de SWCNTs oxidados con HNO <sub>3</sub> durante 24 horas.	108
Figura 4.27. Histogramas de distribución de longitudes de A: MWCNTs oxidados y B: MWCNTs fragmentados por ultrasonidos.	111
Figura 4.28. TGA en Argón de MWCNTs, MWCNTS US y MWCNTsCOOH.	113
Figura 4.29. TGA en Aire de MWCNTs, MWCNTS US y MWCNTsCOOH.	113
Figura 4.30. Espectros XPS de MWCNTs, MWCNTsCOOH y MWCNTsUS.	114
Figura 4.31 A: imagen TEM (200 kV) de aducto AP-MWCNTs (16). B: Imagen TEM de aducto AP-MWCNTs. C: histograma distribución de longitudes obtenido de A.	116
Figura 4.32. TGA en Ar de AP-MWCNTs y NP-MWCNTs.	117
Figura 4.33. TGA en Aire de AP-MWCNTs y NP-MWCNTs.	118
Figura 4.34. Espectro XPS del aducto AP-MWCNTs.	118
Figura 4.35. Formación de micelas de aminopireno en disolución acuosa a pH ácido.	120
Figura 4.36. Espectro de absorción y de emisión de fluorescencia de AP en disoluciones acuosas a pH 2.77, 4.19 y 6.3.	121
Figura 4.37. Cubeta 7Q: suspensión de AP-MWCNTs a pH = 2.77; Cubeta 7G suspensión de AP-MWCNTs a pH = 4.19.	122
Figura 4.38. Espectro de absorción del aducto AP-MWCNTs en disoluciones acuosas a pHs 2.77, 4.19 y 6.3.	123
Figura 4.39. Espectro de emisión de fluorescencia del aducto AP-MWCNTs en disoluciones acuosas a pHs 2.77, 4.19 y 6.3.	123
Figura 4.40. Espectros FTIR de MWCNTs, MWCNTsCOOH, aducto AP-MWCNTs y aducto MWCNTsCOOH-NP.	125
Figura 4.41. Montaje del experimento de dispersión magneto-óptica en soluciones de AP-MWCNTs, sobre un espectrofluorímetro comercial.	127

Figura 4.42. Cuentas de fotones de luz dispersada por soluciones de AP-MWCNTs expuestas (ON) o no (OFF) a un campo magnético .....	128
Figura 4.43. Cuentas de fotones de luz dispersada en presencia (rojo) y ausencia (negro) de un campo magnético aplicado continuamente durante cinco minutos.....	129
Figura 4.44. Dispersión de la luz en el espectrofluorímetro. ....	129
Figura 4.45. Valores de anisotropía de dispersión de luz en presencia y ausencia de un campo magnético externo aplicado continuamente durante 60 s. ....	130
Figura 4.46. Absorbancia (340 nm) vs tiempo de suspensión de AP-MWCNTs en DMF en presencia (ON) y ausencia (OFF) de campo magnético. ....	131
Figura 4.47. Montaje del experimento de transmitancia variando el plano de polarización de luz de soluciones de AP-MWCNTs .....	132
Figura 4.48. Transmitancia a 340 nm de una suspensión de AP-MWCNTs fijada en un gel de agarosa.....	133
Figura 4.49. Espectros de $^1\text{H}$ en $\text{CD}_3\text{OD}$ a temperatura variable de 31. ....	142
Figura 4.50. Mecanismo hidrólisis ésteres en presencia de fenol.....	143
Figura 4.51. Reacción de una amina con escuarato de dietilo.....	146
Figura 4.52. Espectros de $^1\text{H}$ en $\text{CD}_3\text{OD}$ a temperatura variable de 43. ....	148
Figura 4.53. Mecanismo de reacción del acoplamiento de Suzuki. ....	151
Figura 4.54. TGA del aducto 80 en Argón.....	174
Figura 4.55 TGA del aducto 80 en aire .....	174
Figura 4.56. Espectro FT-IR (ATR Ge) del complejo 21, MWCNTsCOOH y aducto 80. ....	175
Figura 4.57. TGA del aducto 82 en Argón.....	177
Figura 4.58. Espectros FT-IR (ATR Ge) de complejo 22b, MWCNTs y Aducto 82.....	178
Figura 4.59. Espectros de excitación y de emisión de fluorescencia de los derivados de DOTAmEtilendiaminaPireno. ....	182
Figura 4.60. Espectros de excitación y de emisión de fluorescencia de los derivados de DOTAmPegPireno.....	185
Figura 4.61. Espectros de emisión de fluorescencia de los complejos 21 y 22b y de los aductos 80 y 82 .....	187
Figura 4.62. Sequenza Inversion Recovery .....	188
Figura 4.63. Misura di $T_1$ con FFC .....	190
Figura 4.64. Sequenza Pre-Polarizzata .....	190
Figura 4.65. Sequenza non pre-polarizzata .....	191
Figura 4.66. Relazione rilassività vs peso molecolare di complessi di Gd(III) con $q=1$ .....	195
Figura 4.67. Profili NMRD dei complessi 21 e 22b.....	196
Figura 4.68. $r_{2p}$ dei complessi di Gd(III) 21 e 22b.....	197



Figura 4.69. Dati spettroscopici UV-visibili dei campioni contenenti nanotubi di carbonio .....	199
Figura 4.70. $R_{1obs}$ di due campioni a concentrazioni diverse di nanotubi ossidati a 25 e 37°C.....	200
Figura 4.71. $R_{1obs}$ di due campioni a concentrazioni diverse e poi normalizzate di MWCNTsCOOH. ....	201
Figura 4.72. $R_{1obs}$ dell'addotto 81 e di MWCNTsCOOH normalizzati rispetto all'addotto 81.....	202
Figura 4.73. $R_{1obs}$ di MWCNTs-US a 25 e 37°C.....	203
Figura 4.74. $R_{1obs}$ di MWCNTs-US e dell'addotto 83 normalizzato rispetto all'addotto a MWCNTs-US.....	204
Figura 4.75. Confronto $R_{1obs}$ , a 25 e 37°C, tra i nanotubi ossidati MWCNTsCOOH e frammentati con gli ultrasuoni MWCNTs-US. ....	205
Figura 4.76. Confronto $R_{2obs}$ , a 25 e 37°C tra nanotubi ossidati MWCNTsCOOH e frammentati con gli ultrasuoni MWCNTs-US. ....	206
Figura 4.77. Profilo NMRD dell'addotto 80.....	210
Figura 4.78. $R_{2obs}$ a 25°C dell'addotto 80.....	211
Figura 4.79. $r_{2p}$ dell'addotto 80 a 25°C.....	211
Figura 4.80. Relassività dell'addotto 82 calcolata usando come bianco l'addotto diamagnetico di La(III) 83.....	213
Figura 4.81. Profilo NMRD addotto 82.....	214
Figura 4.82. A: $R_{1obs}$ degli addotti 82 e 83 a temperatura variabile. B. $r_{1p}$ di 82 a temperatura variabile. ....	216
Figura 4.83. $R_{2obs}$ a 25 e 37°C dell'addotto 82. ....	216
Figura 4.84. $r_{2p}$ addotto 82 a 25°C. ....	217
Figura 4.85. Profilli NMRD addotti 80 e 82.....	218
Figura 4.86. Mapas de $T_1$ (izq) y de $T_2$ (dcha) de una suspensión acuosa ( $10^{-3}$ mg/mL) de aducto 16 AP-MWCNTs. ....	221
Figura 4.87. Mapas de $T_1$ a 300 MHz de los aductos 80 y 82 .....	222
Figura 4.88. $r_{1p}$ de las muestras estudiadas a 300 MHz .....	222
Figura 4.89. Mapas de $T_2$ a 300 MHz de los aductos 80 y 82.....	223
Figura 4.90. Valores de $r_{2p}$ con respecto al agua de las muestras estudiadas. ....	223
Figura 4.91. Mapas de ADC del agua en las tres direcciones ortogonales (A) y gráfico de barras comparativo (B). ....	226
Figura 4.92. Mapas de ADC del aducto 16 AP-MWCNTs en las tres direcciones ortogonales (A), gráficos de barras (B) y estadística total... ..	227
Figura 4.93. Mapa ADC de los tres cortes (A), gráficos de barra y estadística total (B) del complejo 21 .....	228
Figura 4.94. Mapa ADC de los tres cortes (A), gráficos de barra y estadística total (B) del complejo 22b .....	228



Figura 4.95. Mapa ADC de los tres cortes (A), gráficos de barras y estadística total (B) del complejo 45. .... 229

Figura 4.96. Mapa ADC de los tres cortes (A), gráficos de barras y estadística total (B) del aducto 80 ..... 230

Figura 4.97. Mapa ADC de los tres cortes (A), gráficos de barras y estadística total (B) del aducto 82. .... 230

Figura 4.98. Mapa ADC de los tres cortes (A), gráficos de barras y estadística total (B) del aducto 82 ..... 231

## ÍNDICE DE TABLAS

### 2. ANTECEDENTES

Tabla 2.1. Clasificación ACs .....	23
Tabla 2.2. Complejos de Gd (III) empleados en el diagnóstico clínico ..	30
Tabla 2.3. Constantes de afinidad de algunos ACs.....	32

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.1. Energías de interacción y distancias nanotubo - molécula de las configuraciones más estables encontradas para cada sistema.....	78
Tabla 4.2 Cargas de CNTs calculadas para diferentes aductos molécula aromática/nanotubo de carbono.....	80
Tabla 4.3. Energías de interacción, distancias CNT - nitropireno en las diferentes configuraciones del sistema CNT-nitropireno .....	81
Tabla 4.4. Coeficientes de difusión de agua total.....	85
Tabla 4.5. Coeficientes de difusión de agua total para un sistema con un CNT.....	89
Tabla 4.6. Coeficientes de difusión de agua total para un sistema con dos CNT's. ....	90
Tabla 4.7. Coeficientes de difusión de agua total para un sistema con dos CNT's de longitud 100 Å y distancias variables en el eje x.....	91
Tabla 4.8. Coeficientes de difusión de agua total para un sistema con uno, dos o cuatro CNT's.....	91
Tabla 4.9. Coeficientes de difusión "all-atoms" de agua total para un sistema conteniendo un CNT (10, 0).....	93
Tabla 4.10. Resultados TXRF de nanotubos comerciales, oxidados y fragmentados por ultrasonidos.....	112
Tabla 4.11. Datos relativos a las especies encontradas en las muestras MWCNTs, MWCNTsCOOH y MWCNTs US. ....	114
Tabla 4.12. Relación O/C en MWCNTs, MWCNTsCOOH, MWCNTs US.....	115
Tabla 4.13. Análisis TXRF de los aductos con AP y NP.....	117
Tabla 4.14. Analisis XPS de las especies encontradas en el aducto AP-MWCNTs .....	119
Tabla 4.15. Relación O/C y N/C en MWCNTs, MWCNTsCOOH y aducto AP-MWCNTs oxidados .....	119
Tabla 4.16. Condiciones de reacción empleadas para la obtención de bispropiletriamina diBoc .....	165
Tabla 4.17. Estequiometría empleada en la alquilación de TREN con escuarato de etilo .....	170
Tabla 4.18. Concentración de las muestras empleadas en las medidas de fluorescencia de los derivados de DOTAmEtilendiaminaPireno...	181
Tabla 4.19. Intensidades de picos $I_1$ (375 nm), e $I_3$ (383 nm) de los compuestos estudiados y relación $I_1/I_3$ .....	183

Tabla 4.20. Intensidades de picos del excímero ( $I_e$ ) y del monómero ( $I_m$ ) y relación $I_e/I_m$ .....	183
Tabla 4.21. Concentración de las muestras empleadas en la caracterización por fluorescencia de los derivados de DOTAmPegPireno.....	184
Tabla 4.22. Intensidades de picos $I_1$ (375 nm), e $I_3$ (383 nm) de los compuestos estudiados y relación $I_1/I_3$ .....	185
Tabla 4.23. Intensidades de picos del excímero ( $I_e$ ) y del monómero ( $I_m$ ) y relación e $I_e/I_m$ .....	186
Tabla 4.24. Relación $I_e/I_m$ e $I_1/I_3$ para los complejos 21, 22b y los aductos 80 y 82.....	187
Tabella 4.25. Concentrazione dei complessi di Gd(III) studiati.....	194
Tabella 4.26. Valori di $r_{1p}$ (21.5MHz) e $r_{2p}$ (20-70 MHz) dei complessi 21 e 22b .....	195
Tabella 4.27. Parametri ottenuti dal fitting dei profili NMRD dei complessi 21 e 22b .....	197
Tabella 4.28. calcolo di FC per due campioni a concentrazioni diverse di MWCNTs ossidati.....	200
Tabella 4.29. Calcolo di FC per il paragone tra MWCNTs-US e l'addotto 83.....	203
Tabella 4.30. Contenuto metallico % determinato con TXRF di MWCNTsCOOH e MWCNTs-US .....	204
Tabella 4.31. Rapporti tra $r_{2p}$ e $r_{1p}$ di MWCNTs-US, MWCNTsCOOH e Addotto 74 rispetto a MWCNTs-US a 21. 5 MHz, a 25 e 37°C .....	207
Tabella 4.32. Calcolo di FC per il calcolo della rilassività tra MWCNTs-COOH e l'addotto 80 .....	209
Tabella 4.33. Determinazione della concentrazione di Gd(III) nell'addotto 80 .....	209
Tabella 4.34. Determinazione della concentrazione dell'addotto 82.....	212
Tabella 4.35. Calcolo di FC per l'addotto 82 e per l'addotto diamagnetico 83 .....	212
Tabella 4.36. Calcolo di FC per l'addotto 82 e MWCNTs-US .....	213
Tabella 4.37. Parametri ottenuti dal fitting del profilo NMRD dell'addotto 82 .....	215
Tabella 4.38. Contenuto metallico percentuale degli addotti 80 e 82 determinato con TXRF .....	217
Tabella 4.39. Rapporti tra $R_2$ e $R_1$ dei complessi 21 e 22b, dei nanotubi MWCNTs-US e MWCNTsCOOH e degli addotti 80 e 82 rispetto a MWCNTs-US, a 21. 5 MHz, a 25°C.....	218
Tabla 4.40. Valores de $R_{10}$ y $R_{20}$ del aducto 16 AP-MWCNTs.....	221
Tabla 4.41. Relación $r_{2p}/r_{1p}$ de las muestras analizadas. ....	224

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ACs	Agentes de contraste
ADC	Coeficiente de Difusión Aparente
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
AP	Amino Pireno
APT	Attached Proton Test
ATR	Reflectancia Total Atenuada
B <sub>0</sub>	Campo Magnético Aplicado
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
BOPTA	Ácido Benciloximetilentrieminopentaacético
CDI	Carbonildiimidazol
CEST	Intercambio Químico por Transferencia de Saturación
CNTs	Nanotubos de Carbono
CVD	Chemical Vapor Deposition
CVFF	Consistent Valence Force Field
D	Coeficiente De Difusión
DCM o	Diclorometano, Cloruro de Metileno
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad
DIACEST	Intercambio Diamagnético por Transferencia de Saturación
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO3A	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
DOTAma	DOTA mono amida
DTPA	Ácido Trietilentriamínopentaacético
DWI	Difusión en Imagen por Resonancia Magnética
EDAX	Análisis de Energía Dispersada con Rayos X
EM	Espectrometría de Masas
ESI	Ionización Electrospray
HRMS	Espectrometría de Masa de Alta Resolución
FAB	Bombardeo con Átomos Rápidos
FBS	Suero Fetal Bovino
FC	Factor de Corrección
FD	Factor de Dilución
FET	Transistores de Efecto Campo
FFC	Fast Field Cycling
FID	Free Induction Decay
FT-IR	Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier
HPLC-MS	Cromatografía Líquida de Alta Presión Acoplado a EM
ICAM	Moléculas de Adhesión Intracelular Vascular
LDH	Lactato Deshidrogenasa
M <sub>0</sub>	Magnetización
MALDI	Ionización Laser Asistida por Matriz
MRI	Imagen por Resonancia Magnética
MSD	Desplazamiento Cuadrático Medio

MTT	Metil Tiazol Tetrazolio
MWCNTs	Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidona
NMRD	Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion
NP	Nitro Pireno
NVT.	nº de Partículas, Volumen y Temperatura constantes
PARACEST	Intercambio Químico Paramagnético por Transferencia de Saturación
PEG	Polietilenglicol
PET	Tomografía de Emisión de Positrones
PF	Punto de Fusión
QUAD	Cuadrapolo
R <sub>1obs</sub>	Relajatividad Longitudinal Observada
R <sub>2obs</sub>	Relajatividad Transversal Observada
RC	Radiografía Convencional
$r_i$	Relajatividad Molar
RM	Resonancia Magnética
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROI	Región de Interés
RP	Fase Reversa
RPM	Revoluciones por Minuto
RX	Rayos X
SBDS	Dodecilmecenosulfonato de Sodio
SBM	Solomon Bløembergen y Morgan
SEAr	Sustitución Electrofila Aromática
SPC	Simple Point Charge Force Field
SPIOs	Partículas superparamagnéticas de Óxido de Hierro
SQUID	Dispositivo Superconductor de Interferencia Cuántica
SWCNTs	Nanotubos de Carbono de Pared Sencilla
T <sub>1</sub>	Tiempo de Relajación Longitudinal
T <sub>2</sub>	Tiempo de Relajación Transversal
TAC	Tomografía Axial Computerizada
TEA	Trietilamina
TEM	Microscopio Electrónico de Transmisión
TFA	Ácido Trifluoroacético
TGA	Análisis Termogravimétrico
TGA-MS	Análisis Termogravimétrico Acoplado a Masas
TLC	Cromatografía de Placa Fina
TMS	Tetrametilsilano
TOF	Tiempo de Vuelo
Tol	Tolueno
TREN	<i>N,N'</i> -bis(2-aminoetil)etan-1,2-diamina
TTHA	Ácido trietilentetraminohexaacético
TXRF	Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total
US	Análisis Ultrasónico
USPIOs	Partículas superparamagnéticas de Óxido de Hierro Ultra Pequeñas
XPS	Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X

## NOTAS SOBRE LA PUNTUACIÓN

Con el fin de simplificar la publicación de resultados en revistas internacionales que requieren la utilización del sistema científico de puntuación, se ha adoptado este sistema a lo largo de esta Tesis Doctoral. Así las cifras decimales se indican con puntos en lugar de comas, lo que ha sido aceptado por la Real Academia Española de Lengua en el *Diccionario Panhispánico de Dudas* desde su primera edición en octubre de 2005.

## NOTAS SOBRE LAS REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

En la presente Memoria, las referencias bibliográficas se encuentran a pie de página. Consecuentemente existen citas bibliográficas repetidas, pero se ha preferido mantener este criterio y proporcionar la información bibliográfica completa en cada página, facilitando así su lectura.

## NOTAS SOBRE LA NOMENCLATURA Y LA NUMERACIÓN DE LAS MOLÉCULAS

En la parte experimental cada molécula sintetizada se nombra según la IUPAC, no obstante para facilitar la lectura de la presente Memoria en el texto para algunas moléculas se opta por emplear un nombre abreviado trivial, especificado en cada caso.

El criterio empleado para la numeración de las moléculas es por orden de aparición en el texto de la Memoria. Las moléculas empleadas en el apartado de modelización molecular no respetan este criterio y llevan su propia numeración.



## Abstract

---





# MAGNETICALLY LABELLED CARBON NANOTUBES AS CONTRAST AGENTS FOR MAGNETIC RESONANCE IMAGING

## INTRODUCTION

The aim of this Thesis is to develop, characterize and evaluate a new generation of anisotropic Contrast Agents (CAs) for Magnetic Resonance Imaging (MRI), able to provide non invasive information on the spatial orientation of the CA with respect to the external magnetic field. To this end, we report here the preparation and properties of magnetically labeled carbon nanotubes (CNTs) with cylindrical geometry, able to inform by MRI, on the preferred direction of water diffusion around the probe and its directional magnetic relaxation, thus revealing its molecular orientation. These results may unravel novel MRI applications as contrast agents for Diffusion Tensor Imaging and to assess the rheology of microvascular tissue perfusion or its alterations in pandemic diseases as atherothrombosis and ischemic episodes.

## BACKGROUND

MRI is currently one of the preferred techniques for clinical diagnosis. It uses the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) phenomenon to obtain detailed images of the human body in a fully non-invasive, non-destructive, manner. MRI presents numerous advantages including the absence of ionizing radiations; the high spatial resolution, the large versatility of intrinsic and extrinsic contrast mechanisms available and the possibility of obtaining multiplanar, 3D or even dynamic images across the human body. MRI contrast is normally produced by modifying locally the water protons longitudinal and transversal relaxation times  $T_1$  and  $T_2$ , or the magnetic susceptibility  $T_2^*$  of specific elements of the imaged object. Since the discovery of MRI, a variety of pharmacological compounds have been classically used to improve MRI sensitivity and resolution.

Chemical Name	Commercial name	Company	Classification
$[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$	Magnevist	Schering (Alemania)	Extracelular
$[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$	Dotarem	Guerbet (Francia)	Extracelular
$[\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})(\text{H}_2\text{O})]$	Omniscan	Nycomed-Amersham (UK)	Extracelular
$[\text{Gd}(\text{HP-DO3A})(\text{H}_2\text{O})]$	Prohance	Bracco (Italia)	Extracelular
$[\text{Gd}(\text{DO3A-butrol})(\text{H}_2\text{O})]$	Gadovist	Schering (Alemania)	Extracelular
$[\text{Gd}(\text{BOPTA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$	Multihance	Bracco (Italia)	Hepatobiliar-extracelular

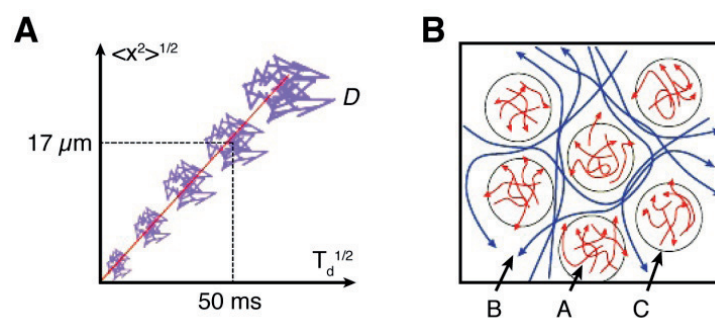
Nowadays, additional types of contrast agents have been proposed such as coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles; magnetization transfer contrast agents (CEST), improved paramagnetic Gd(III) complexes attached to various macromolecules or even diamagnetic probes used as functional pH biomarkers by spectroscopic imaging. In this Thesis, we will contribute and investigate new derivatives from 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid DOTA.

The nanocylindrical geometry of the new CAs is achieved by choosing carbon nanotubes, which are the fourth allotropic form of carbon. CNTs were discovered by Iijima in 1991 and since then, they have become widely used in different fields of material science because of to their unusual and very favorable electronic, mechanic, optical and chemical properties. Moreover, numerous papers on CNTs have been published describing them as promising tools in nanomedicine. In particular, different strategies have been implemented to obtain adequate functionalization of these systems, to increase their solubility in water or in organic solvents, and to decrease their potential toxicity.

Another important source of contrast to be mentioned here is the diffusion weighted magnetic resonance imaging (DWI) contrast, a kind of intrinsic contrast based in the differences in the translational diffusion parameters of water in cells and tissues. The DWI method able to measure the random translational diffusion coefficient (ADC) of water in any spatial direction of solutions, suspensions cells or tissues, yielding 3D-ADC maps. The strategy is based in the original Stejskal and Tanner sequence

proposed in the 60's, a variant of the spin echo sequence including an imbricated diffusion sensitizing gradient. Since the diffusion weighting gradient can be oriented in any spatial direction, the ADC can be measured in all possible orientations.

Water molecules are envisioned by DWI as probes able to reveal the microarchitecture of the healthy or diseased tissues. Einstein's theory defined that brownian water diffusion is limited by the presence of molecular obstructions, so ADC is determined by molecular crowing and microviscosity, thus revealing the tissue microstructure. Tissues and organs are highly organized anisotropic systems, resulting in an anisotropic ADC in vivo. This is observed mainly in the Central Nervous system, where the tubular organization of myelin sheaths, determine easier diffusion along, than perpendicular to the myelin fibers. This makes possible to obtain cerebral tractography maps, revealing the spatial orientation of the white matter fibers, as measured in every pixel by the Diffusion Tensor (the vector resulting from ADC measurements in several directions). Notably, despite the impressive development of DWI, no contrast agents have been proposed to modulate ADC contrast up to now. In this thesis, I will propose the first generation of these agents.



**Figure I.** A: Average diffusion paths sampled during increasing diffusion times. B: Restrictions, obstructions and tortuosity of Intra- and extracellular diffusion paths.

## OBJECTIVES

The general objective of this Thesis is to design, prepare and characterize a new generation of magnetically anisotropic CAs using carbon nanotubes as scaffold and Gd(III) DOTA mono amide complexes as imaging agents. To reach this objective we have pursued the following specific tasks:

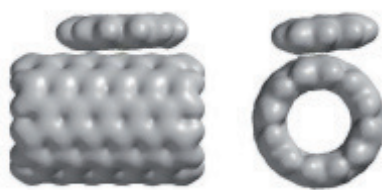
- ✓ Molecular calculations in model systems
- ✓ Fragmentation and functionalization of SWCNTs
- ✓ Fragmentation and functionalization of MWCNTs
- ✓ Synthesis and characterization pyrene ligands with Gd(III) complexes of DOTAmo amide (DOTAma) derivatives.
- ✓ Synthesis and characterization of  $\pi$ - $\pi$  adducts of pyrene derivatives and carbon nanotubes.
- ✓ Investigation of relaxometric properties.
- ✓ Cytotoxicity studies.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Molecular modelling

As illustrative models, we have calculated the interactions between carbon nanotubes (6.6) and several pyrene derivatives using the Density Function Theory (DFT). We built models with three relative orientations between the aromatic molecules and the carbon nanotube, parallel; parallel shifted and perpendicular. We calculated then the energies for the interaction and the preferred orientation of the molecules. We investigated the influence of the number of aromatic rings as well as the presence of functional groups and their relative position to the CNT's. Charge transfer interaction energy values and the distribution of electronic density show that the main interaction is  $\pi$ - $\pi$  type as illustrated in the figure below. The most favorable configurations are parallel shifted for all systems.

Besides, we calculated theoretically the diffusion coefficients of water using Molecular Dynamics approaches with two methods: "all-atoms" and "coarse grained".

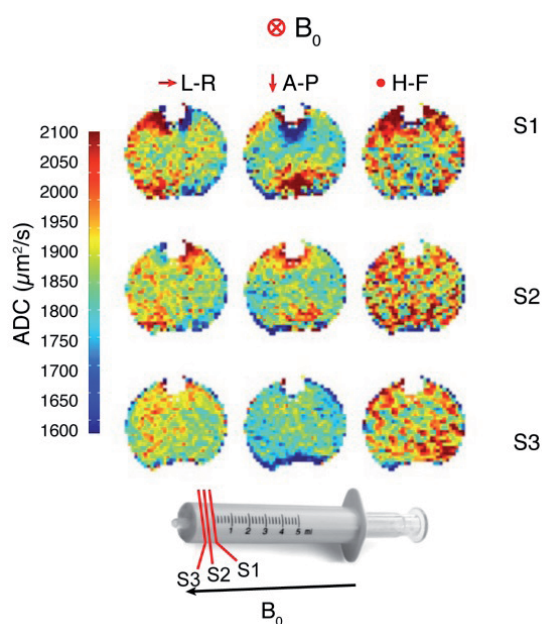


**Figure II.** Electron density surface for molecule 7.

Both “all-atoms” and “coarse-grained” calculations showed that the movement of the water inside the CNTs, is slower than the movements of water outside, revealing a clear anisotropic diffusion, not following a Fick’s model, faster in the longitudinal direction.

### SWCNTs-Single-walled carbon nanotubes.

SWCNTs were refluxed with nitric acid for 24 and 48 hours. The resulting oxidized SWCNTs, contaminated with Ni and Y catalysts, gave homogeneous suspensions in water. Suspensions of SWCNTs oxidized for 24 hours were used to obtain ADC maps in three orthogonal directions, revealing a preferred diffusion orientation in the parallel direction to the magnetic field  $B_0$  (H-F). The observed anisotropic ADC is consistent with the alignment of carbon nanotubes with the main magnetic field. This fact confirmed that carbon nanotubes induce an anisotropic diffusion of surrounding water as illustrated in the figure below.

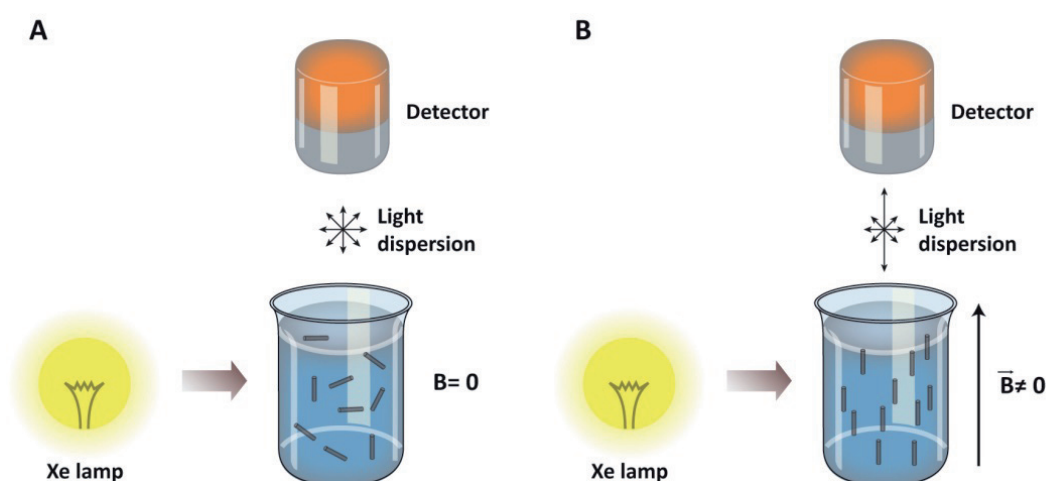


**Figure III.** SWCNTsCOOH ADC Maps

SWCNTs preparations were further characterized by Atomic Force Microscopy (AFM), Thermogravimetric analysis (TGA) and Transmission Electron Microscopy (TEM), while the magnetic properties were investigated by Superconducting Quantum interference Device (SQUID). The cytotoxicity was assessed by MTT and LDH assays, which did not show significant cytotoxic effects at the concentrations used to perform the studies of magnetic anisotropy.

### MWCNTs- Multi-Walled Carbon Nanotubes

Commercial MWCNTs were shortened using either oxidative or ultrasound methods. Both methods yield carbon nanotubes with lengths distributing from 50 to 300 nm, being those obtained by the oxidative method slightly shorter, according to TEM measurements. Functionalization is observed by TGA and FTIR. Metal contaminants are analyzed by TXRF revealing that the metal contents of the preparations decrease in the fragmentation process.  $\pi$ - $\pi$  adducts between shortened nanotubes and aminopyrene are prepared to be used as models in the fluorescence studies at different values of pH. Furthermore, we used light dispersion, as detected in magneto-optical experiments, to confirm the preferred nanotube alignment along the magnetic field.



**Figure IV.** Light dispersion in spectrofluorimeter in non-oriented (A) and oriented (B) nanotube suspensions.

Magnetic anisotropy properties were studied with preparations of MWCNTs showing that anisotropy depends on the length; the diameter and inhomogeneity of the nanostructure, as well as on the presence of Ni nanoparticles.

### Synthesis of pyrene derivative ligands with DOTA mono amide (DOTAma) Gd(III) complexes.

We synthesized several functionalized MWCNTs with DOTA mono amide derivatives, through the formation of  $\pi$ - $\pi$  adducts with different properties and characteristics. Properties of these preparations included: i) Favored water solubility; ii) Increased  $\pi$ - $\pi$  interaction between the paramagnetic probe and the carbon nanotube surface; and iii) Increased relaxivity. Four structures have been investigated for this purpose:

DOTAmaEthylendiaminePyrene (21); DOTAmaPegPyrene (22b); DOTAmaBenzenePyrene (23) with the benzene ring attached to the pyrene ring by Suzuki coupling; and BisDOTAmaPyrene (24) containing two Gd(III) chelate units.

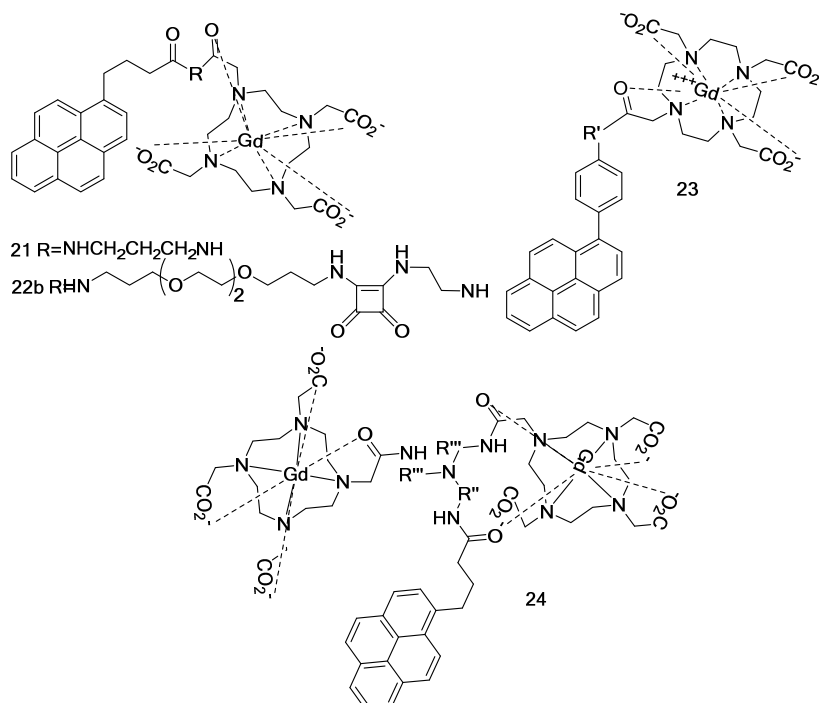


Figure V. Proposed Gd(III) complexes.



Gd(III) and La(III) complexes from **21** and **22b** were obtained and characterized by NMR, FT-IR and Mass spectrometry. Fluorescence spectra show the typical profile obtained from pyrene in polar solvents. The relaxometric curves by NMRD are similar to those from DOTama derivatives.

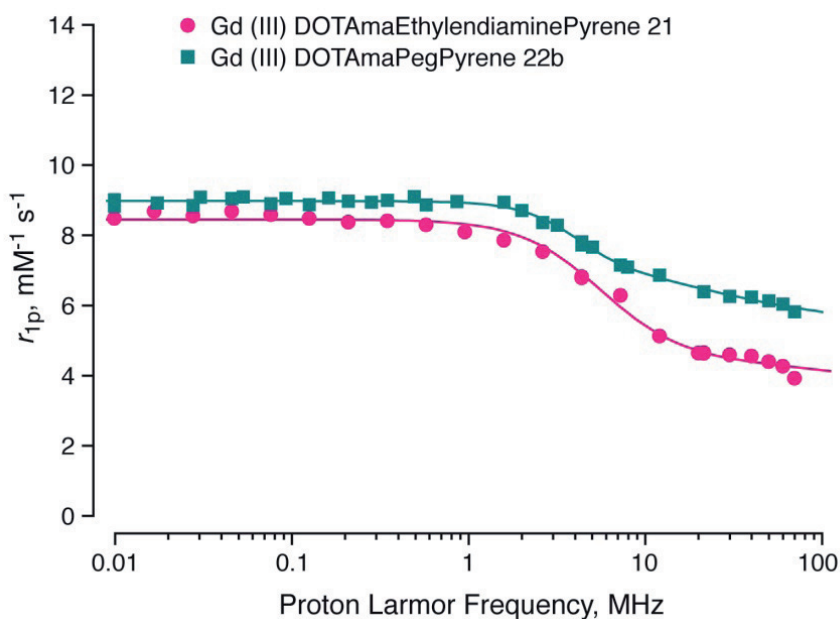


Figure VI. Gd(III) complexes relaxivity

### MWCNTs and DOTama derivatives $\pi$ - $\pi$ adducts

Either oxidized MWCNTs or MWCNTs-US were treated with DOTamaEthylendiaminePyrene and DOTamaPegPyrene in water under ultrasound (US) irradiation.

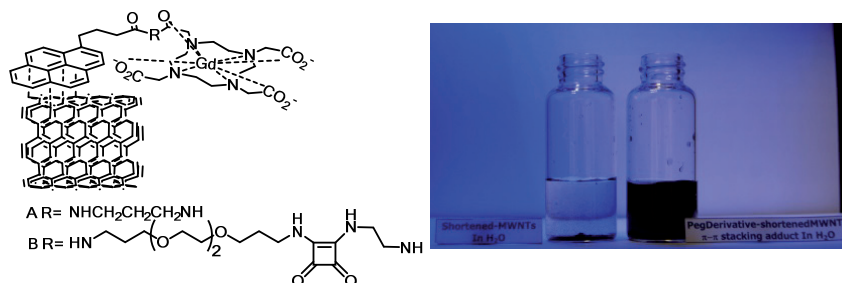


Figure VII.  $\pi$ - $\pi$  stacking adducts formation.

The resulting adducts were remarkably water soluble and were further characterized by FT-IR; TGA; TXRF. Their fluorescence spectra are similar

to the other complexes obtained in this work. However, relaxometry studies reveal higher values than those obtained with other complexes in solution. The relative increase of  $r_2$  relaxivity is higher than the  $r_1$  relaxivity.

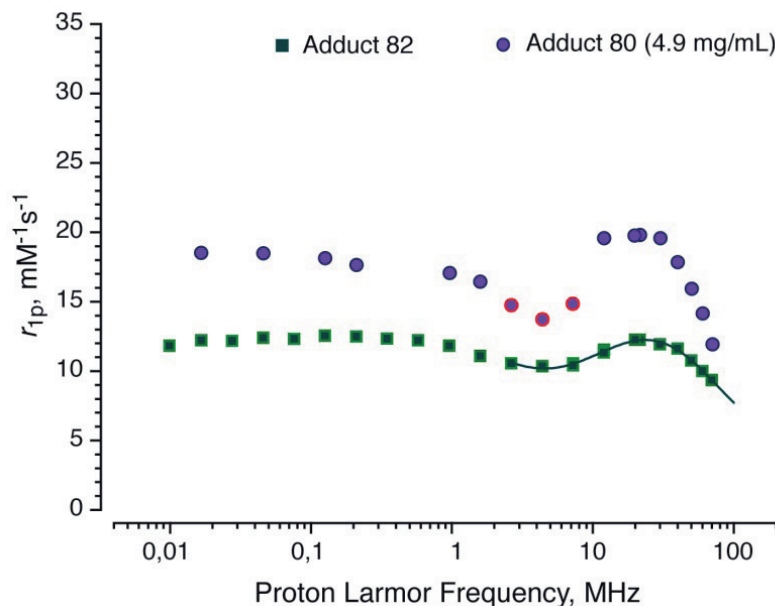


Figure VIII.  $\pi$ - $\pi$  stacking adducts relaxivity.

## CONCLUSIONS

We accomplished the proposed objectives. Briefly, two  $\pi$ - $\pi$  adducts have been obtained that originate very stable suspensions in water. These new adducts are shown to induce anisotropic diffusion of surrounding water by alignment of MWCNTs in the parallel direction of the static magnetic field  $B_0$ . Taken together, the present results with MWCNTs improve considerably our previous findings with SWCNTs. Finally, the presence of a pyrene unit induces fluorescence; a property which allows adducts to be used as bimodal, MRI and fluorescent, imaging probes.



# 1. Introducción

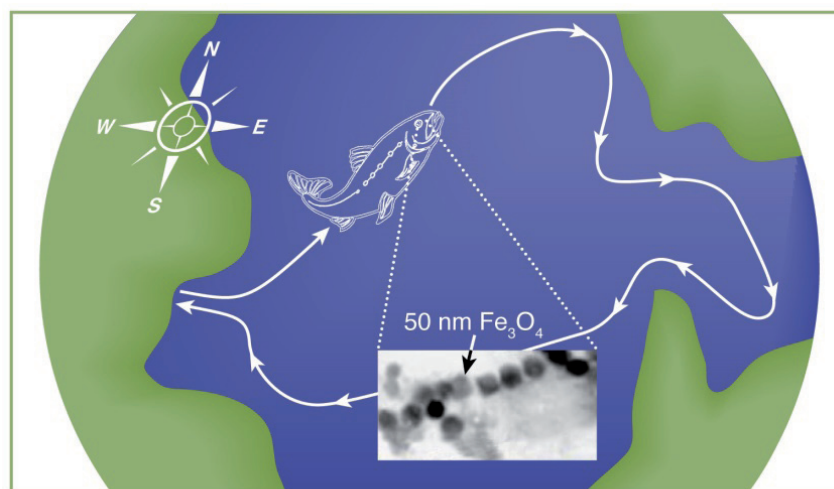
“L'unica gioia al mondo è cominciare. È bello vivere perchè vivere è cominciare, sempre ad ogni istante.”

Cesare Pavese



## 1.1. INTRODUCCIÓN

La orientación y la polaridad subyacen a los más importantes eventos en Biología. Permiten encontrar la dirección del crecimiento en plantas y animales, dirigir la migración de células para construir órganos y organismos y orientar en el espacio las migraciones de insectos, peces (Figura 1.1) y pájaros, entre otros.<sup>1-3</sup> Todos estos eventos están dirigidos a nivel molecular por la orientación precisa de moléculas específicas, capaces de distinguir la dirección correcta entre todas las posibles y orientar la respuesta biológica en una sola dirección. Nuestro conocimiento actual no ha podido dilucidar aún, cuales son los mecanismos moleculares que subyacen a estos fenómenos, pero muy posiblemente se basan, en la anisotropía en distribución de los estímulos que determinan la direccionalidad, en la organización anisotrópica de las moléculas diana sensoras, o en una combinación de estas circunstancias.



Migración del salmón (decenas de millares de km)

**Figura 1.1.** Sistema de navegación natural del salmón basado en partículas superparamagnéticas localizadas en su sistema nervioso. Tomada de la referencia 3.<sup>3</sup>

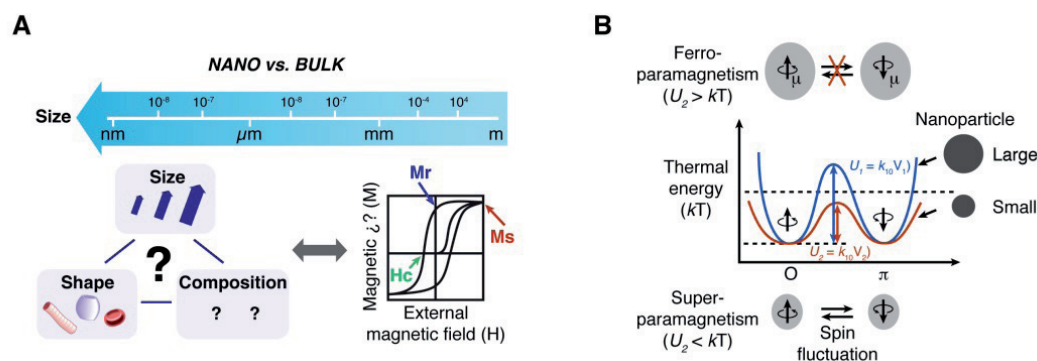
<sup>1</sup> Gee, H. Migratory magnetism. *Nature* **1999**, DOI 10.1038/news991007-7.

<sup>2</sup> Maffei, M. E. Magnetic field effects on plant growth, development, and evolution. *Frontiers in Plant Science* **2014**, 5(445), 1-14.

<sup>3</sup> Walker, M. M.; Diebel, C. E.; Haugh, C. V.; Pankhurst, P. M.; Montgomery, J. C.; Green, C. R. Structure and function of the vertebrate magnetic sense. *Nature* **1997**, 390(6658), 371-376.

Un mecanismo de particular relevancia en este sentido es la magnetocepción, un proceso que permite detectar la orientación del campo magnético terrestre mediante sensores magnéticos celulares y establecer así la dirección de movimiento, como si las células y animales que lo incorporan dispusieran de una brújula incorporada. El proceso utiliza nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , cuya composición microcristalina determina la presencia de un momento magnético resultante que se orienta en la dirección del campo magnético terrestre.<sup>4</sup>

El tamaño, la forma y la composición de las nanopartículas determinan en gran parte sus propiedades magnéticas (Figura 1.2 A). La Figura 1.2 B muestra que las partículas magnéticas más pequeñas (paramagnéticas) se reorientan muy rápidamente por las fluctuaciones térmicas, mientras que partículas magnéticas más grandes (ferromagnéticas) presentan una energía de activación rotacional que supera la barrera térmica y hace que sus momentos magnéticos permanezcan orientados a temperatura ambiente.



**Figura 1.2.** Propiedades magnéticas de las nanopartículas. A: En la escala nanométrica, propiedades como la forma, el tamaño y la composición afectan marcadamente las propiedades magnéticas (coercitividad, remanencia, susceptibilidad magnética). B: Las nanopartículas ferromagnéticas de gran tamaño mantienen la orientación de su momento magnético debido a que su energía de activación en la reorientación  $U$  es superior a las fluctuaciones térmicas  $kT$  ( $U > kT$ ), mientras que las partículas paramagnéticas de menor tamaño presentan una reorientación magnética isotrópica pues su energía de activación reorientacional es inferior a la energía térmica  $kT$  ( $U < kT$ ). Adaptada de la ref 4.<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Jun, Y. W.; Seo, J. W.; Cheon, A. Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences. *Accounts of Chemical Research* **2008**, 41 (2), 179-189.

Esta Tesis se basa en estos conceptos y aborda la detección no invasiva de la orientación molecular empleando técnicas de Imagen por Resonancia Magnética (MRI). En general, se propone una nueva familia de agentes de contraste anisotrópicos basados en nanotubos de carbono, funcionalizados con complejos paramagnéticos de Gd(III) que permiten la detección no invasiva de la orientación molecular empleando MRI. Una breve introducción a la historia de los agentes de contraste, ayudará a enmarcar mejor el trabajo realizado.

La historia de los agentes de contraste para MRI comienza casi simultáneamente con el descubrimiento de la técnica.<sup>5</sup> Pocos años después de haber propuesto su nueva metodología de imagen, Paul Lauterbur y sus colaboradores describieron la utilización de metales paramagnéticos como agentes de contraste.<sup>6</sup> Aunque la excelente resolución y contraste intrínseco de la MRI no parecía requerir, en un principio, la utilización de moléculas exógenas para resaltar el contraste, pronto se descubrieron las enormes ventajas de los agentes de contraste exógenos para resaltar lesiones difícilmente observables sin su utilización. El éxito de la MRI como técnica diagnóstica despertó pronto el interés de la industria farmacéutica que se comprometió en el desarrollo de estas moléculas. Dado que la administración de metales paramagnéticos en altas dosis, podía resultar tóxica, se propuso su administración en forma quelada, para disminuir su toxicidad. La compañía Schering patentó, en 1983,<sup>7</sup> el primer preparado de Gd(III) clínicamente utilizable, basado en el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), que ya había sido utilizado previamente como complejante de radionúclidos en medicina nuclear. Poco después, siguieron los desarrollos de complejantes macrocíclicos basados en macrólidos, como el Gd(III)DOTA (Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético). Estas dos moléculas

---

<sup>5</sup> Lauterbur, P. C. Image Formation by Induced Local Interactions - Examples Employing Nuclear Magnetic-Resonance. *Nature* **1973**, *242* (5394), 190-191

<sup>6</sup> Mendoncadas, M. H.; Gaggelli, E.; Lauterbur, P. C. Paramagnetic Contrast Agents in Nuclear Magnetic-Resonance Medical Imaging. *Seminars in Nuclear Medicine* **1983**, *13* (4), 364-376.

<sup>7</sup> Gries, H. D.; Rosenberg, D. D.; Weinmann, H. J. D. Paramagnetische komplexsalze, deren herstellung und verwendung bei der nmr-diagnostik. 10-2-1983. DE3129906 A1



constituyeron la base de la primera generación de agentes de contraste lineales, o cíclicos, que aún se encuentran en explotación. Su principal ventaja, residía en resaltar la intensidad de las imágenes MRI pesadas en  $T_1$ , en las regiones donde se acumulaban.

Sin embargo, los complejos iniciales Gd(III)DTPA y Gd(III)DOTA estaban limitados tanto por una relajatividad relativamente baja, que imponía la utilización de elevadas concentraciones, como por una selectividad muy escasa, que limitaba el contraste selectivo de órganos y lesiones específicas. La búsqueda de agentes de contraste con propiedades de relajatividad y selectividad mejoradas marcó el desarrollo de la segunda generación de agentes de contraste basados en la manipulación de la quelación para optimizar la relajatividad según la teoría de Solomon-Bloembergen-Morgan.<sup>8</sup>

Un importante progreso se produjo con la incorporación de múltiples unidades de complejo de Gd(III) sobre macromoléculas, lo que permitió retrasar los periodos de eliminación renal, mejorando la relajatividad y selectividad de los complejos macromoleculares por estructuras específicas.<sup>9</sup> De hecho, para una correcta visualización por MRI de las células cargadas con complejos de Gd(III) hacen falta  $10^7$ - $10^9$  unidades de quelatos metálicos por célula, lo que implica numerosas ventajas para las construcciones moleculares conteniendo un elevado número de quelatos por moléculas.<sup>10</sup> Un avance más en esta dirección fue la utilización de dendrímeros que permiten obtener polímeros basados en DTPA o DOTA, con generaciones siempre crecientes.<sup>11</sup>

---

<sup>8</sup> Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chemical Reviews* **1999**, *99* (9), 2293-2352.

<sup>9</sup> Tei, L.; Barge, A.; Crich, S. G.; Pagliarin, R.; Negri, V.; Ramella, D.; Cravotto, G.; Aime, S. Target Visualization by MRI Using the Avidin/Biotin Amplification Route: Synthesis and Testing of a Biotin-Gd-DOTA Monoamide Trimer. *Chemistry-A European Journal* **2010**, *16*(27), 8080-8087.

<sup>10</sup> Aime, S.; Castelli, D. D.; Crich, S. G.; Gianolio, E.; Terreno, E. Pushing the Sensitivity Envelope of Lanthanide-Based Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agents for Molecular Imaging Applications. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42* (7), 822-831.

<sup>11</sup> Talanov, V. S.; Regino, C. A.; Kobayashi, H.; Bernardo, M.; Choyke, P. L.; Brechbiel, M. W. Dendrimer-based nanoprobe for dual modality magnetic resonance and fluorescence imaging. *Nano Letters* **2006**, *6* (7), 1459-1463.

También se comenzaron a utilizar nanopartículas superparamagnéticas o ferromagnéticas.<sup>12,13</sup> Las más utilizadas eran nanopartículas de óxidos ferroso-férricos  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de ultrapequeño (Ultra Superparamagnetic Iron Oxide Nano Particles, USPIOs) o pequeño tamaño (Superparamagnetic Iron Oxide Nano Particles, SPIOs).<sup>14</sup> Estas nanopartículas constaban de un núcleo compuesto por uno o más nanocristales de magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , recubierto por dextrano, derivados entrecruzados de dextrano o por otros materiales como sílice o polímeros de ácido acrílico, entre otros. Estos recubrimientos, fácilmente derivatizables, permitían un fácil acceso del agua circundante al núcleo magnético y permitían decorar las nanopartículas con diferentes reactivos direccionales (péptidos, anticuerpos...), pudiéndolas dirigir fácilmente contra dianas moleculares específicas.<sup>15,16</sup> En estas nanopartículas, el alineamiento cooperativo de los momentos magnéticos individuales de los átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Fe}^{2+}$ , produce un comportamiento ferromagnético con un momento magnético resultante muy superior al paramagnetismo de los átomos individuales de  $\text{Gd(III)}$ , lo que permitía una sensibilidad muy superior en el entorno picomolar, próximo a la concentración de los receptores celulares. Estas estructuras resultaban principalmente activas en  $T_2$ , por lo que oscurecen, las zonas de la imagen donde se acumulan, un aspecto poco importante pero que terminó por no favorecer su utilización clínica. De hecho, los fabricantes de

---

<sup>12</sup> Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Elst, L. V.; Muller, R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (6), 2064-2110.

<sup>13</sup> Weissleder, R.; Elizondo, G.; Wittenberg, J.; Rabito, C. A.; Bengel, H. H.; Josephson, L. Ultrasmall Superparamagnetic Iron-Oxide - Characterization of A New Class of Contrast Agents for Mr Imaging. *Radiology* **1990**, *175*(2), 489-493.

<sup>14</sup> Wang, Y. X. J.; Hussain, S. M.; Krestin, G. P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *European Radiology* **2001**, *11*(11), 2319-2331

<sup>15</sup> Kresse, M.; Wagner, S.; Pfefferer, D.; Lawaczek, R.; Elste, V.; Semmler, W. Targeting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles to tumor cells in vivo by using transferrin receptor pathways. *Magnetic Resonance in Medicine* **1998**, *40* (2), 236-242.

<sup>16</sup> Veiseth, O.; Gunn, J. W.; Zhang, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62* (3), 284-304.

agentes de contraste nanoparticulados, abandonaron su producción recientemente.

Mención especial merecen los agentes de contraste basados en procesos de transferencia de magnetización (Chemical Exchange Saturation Transfer, CEST)<sup>17,18</sup> bien en su configuración diamagnética o paramagnética (PARACEST). El abordaje CEST se basa en el intercambio químico de moléculas de H<sub>2</sub>O entre el agente y el tejido circundante, un proceso que puede hacerse sensible a condiciones del entorno muy específicas, pudiéndose generar contraste derivado de cambios en el microentorno extracelular, principalmente de pH, iones monovalentes o divalentes, metabolitos, temperatura, etc.<sup>19-22</sup> Sin embargo, a pesar del enorme progreso realizado, muchas de las limitaciones de los agentes de contraste originales, permanecen en la actualidad. En particular, la escasa proporción del agente de contraste utilizada para resaltar la intensidad de la imagen en la región de interés, convierte en superflua la administración de elevadas concentraciones del mismo, que por otro lado, resultan eliminadas del organismo rápidamente. Por tanto, una importante mejora constituiría la administración de menores dosis de agentes de contraste, pero más selectivas para una diana específica y con relajatividad exacerbada para incrementar su sensibilidad.

---

<sup>17</sup> Guivel-Scharen, V.; Sinnwell, T.; Wolff, S. D.; Balaban, R. S. Detection of proton chemical exchange between metabolites and water in biological tissues. *Journal of Magnetic Resonance* **1998**, *133* (1), 36-45.

<sup>18</sup> Terreno, E.; Castelli, D. D.; Aime, S. Encoding the frequency dependence in MRI contrast media: the emerging class of CEST agents. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2010**, *5* (2), 78-98.

<sup>19</sup> Ren, J.; Trokowski, R.; Zhang, S.; Malloy, C. R.; Sherry, A. Imaging the Tissue Distribution of Glucose in Livers Using A PARACEST Sensor. *Magnetic Resonance in Medicine* **2008**, *60* (5), 1047-1055.

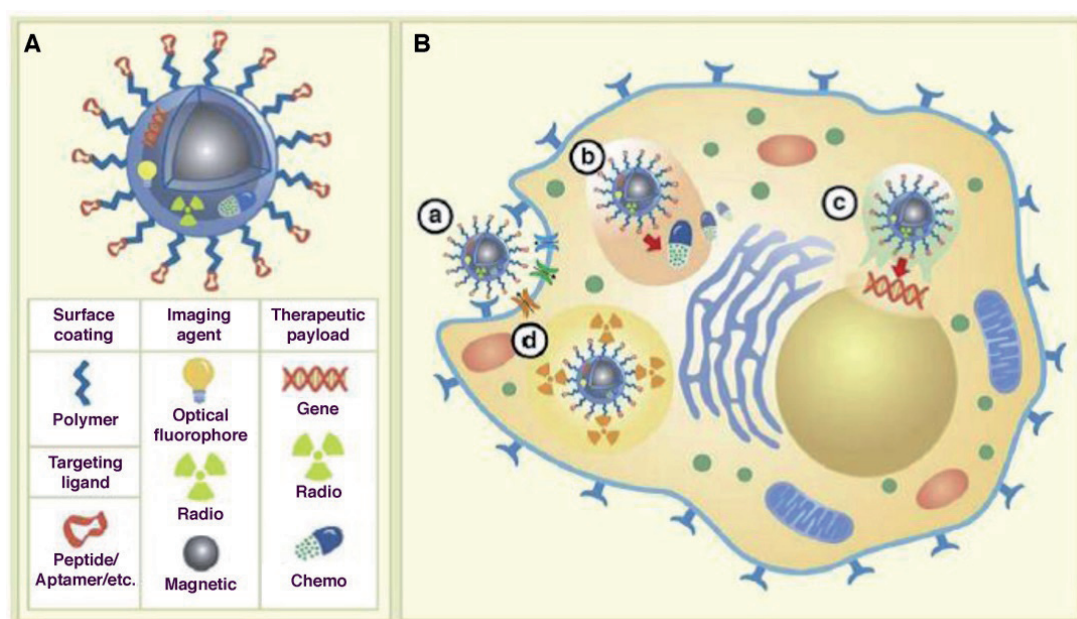
<sup>20</sup> Aime, S.; Barge, A.; Delli Castelli, D.; Fedeli, F.; Mortillaro, A.; Nielsen, F. U.; Terreno, E. Paramagnetic lanthanide(III) complexes as pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agents for MRI applications. *Magnetic Resonance in Medicine* **2002**, *47* (4), 639-648.

<sup>21</sup> Aime, S.; Delli Castelli, D.; Fedeli, F.; Terreno, E. A paramagnetic MRI-CEST agent responsive to lactate concentration. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (32), 9364-9365.

<sup>22</sup> Delli Castelli, D.; Terreno, E.; Aime, S. Yb-III-HPDO3A: A Dual pH- and Temperature-Responsive CEST Agent. *Angewandte Chemie-International Edition* **2011**, *50* (8), 1798-1800.

Los recientes avances en Nanotecnología pueden permitir superar estas dificultades mediante la integración de los agentes de contraste mencionados previamente sobre plataformas nanotecnológicas.

De hecho esta integración ha permitido el gran desarrollo de la imagen molecular actual, entendida como conjunto de modalidades de imagen para visualizar no invasivamente procesos biológicos o patológicos fundamentales.<sup>23</sup> Este nuevo abordaje ha revolucionado la química, la biología y la nanomedicina, propiciando el desarrollo de nuevas nanopartículas multifuncionales (Figura 1.3).



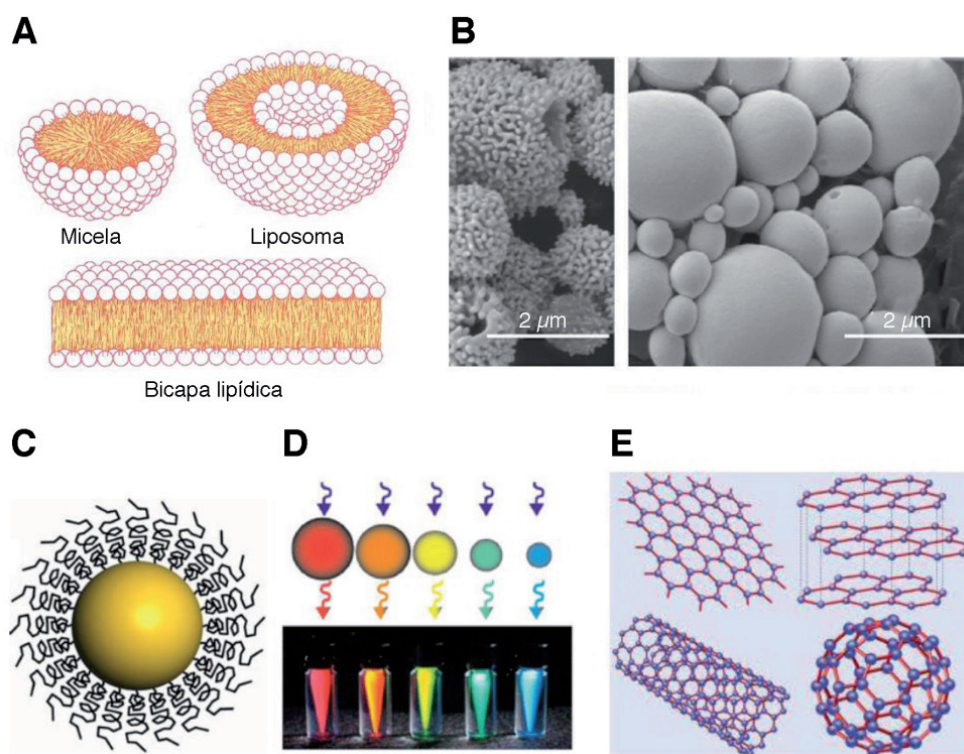
**Figura 1.3.** Nanopartículas multifuncionales de contraste para imagen molecular y potencial mecanismo de acción a nivel celular. **A:** Estructura general de una nanopartícula conteniendo un núcleo magnético, radioactivo u óptico, una superficie derivatizable con ligandos direccionales y una carga terapéutica constituida por genes, siRNAs, radionúclidos o agentes quimioterápicos. **B:** Tráfico intercelular de nanopartículas multifuncionales, a) unión a receptores específicos, b) liberación del contenido en endosomas, c) liberación del gen al núcleo celular, d) decaimiento radiactivo de radionúclidos.<sup>16</sup>

Estas pueden contener una o más moléculas activas en las diferentes regiones del espectro electromagnético, incluyendo radionúclidos, sensores

<sup>23</sup> Weissleder, R.; Pittet, M. J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **2008**, *452* (7187), 580-589.

<sup>16</sup> Veisheh, O.; Gunn, J. W.; Zhang, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62* (3), 284-304.

ópticos y de radiofrecuencia (tanto paramagnéticos como ferromagnéticos), moléculas de reconocimiento celular (anticuerpos o ligandos específicos) para receptores de superficie o cargas terapéuticas como citostáticos, genes o siRNAs, todos ellos anclados sobre el mismo andamiaje molecular.<sup>16</sup> Este nuevo abordaje permite, no sólo visualizar la distribución de receptores celulares de superficie, enzimas, u otras moléculas diagnósticas de interés, sino liberar los fármacos transportados de manera selectiva, tan sólo en las células conteniendo un receptor específico (Figura 1.3). La utilización de los agentes de contraste para imagen molecular, se han visto favorecida por la aparición de tecnologías de imagen híbrida, que combinan sobre la misma plataforma dos o más modalidades de imagen, como los instrumentos PET/MRI.<sup>24</sup>



**Figura 1.4.** Plataformas nanotecnológicas utilizadas en bioimagen. A: Nanopartículas lipídicas, liposomas y micelas, B: Nanopartículas de PLGA (poliláctico glucólico), C: Nanopartículas de oro, D: Quantum dots y E: Derivados de grafeno, fulerenos y nanotubos.

<sup>16</sup> Veisesh, O.; Gunn, J. W.; Zhang, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62 (3), 284-304.

<sup>24</sup> Pichler, B. J.; Judenhofer, M. S.; Wehrl, H. F. PET/MRI hybrid imaging: devices and initial results. *European Radiology* **2008**, 18 (6), 1077-1086.



La Figura 1.4 resume diversas plataformas que se han desarrollado para este fin. Básicamente se trata de nanopartículas de ácido poliláctico glucólico, nanopartículas lipídicas, nanopartículas de oro y “quantum dots” o diferentes formas alotrópicas del carbono, como los fulerenos y los nanotubos de carbono.

Brevemente, se han utilizado nanopartículas lipídicas, o vesículas lipídicas y liposomas.<sup>25,26</sup> Estas nanopartículas permiten encapsular en el lumen liposomal, los agentes de contraste escogidos, conjuntamente con principios terapéuticos, combinando las propiedades diagnósticas con las terapéuticas, constituyendo así verdaderos agentes teragnósticos.<sup>27</sup>

También se han utilizado, aunque con menor extensión, nanopartículas de ácido poliláctico glucólico u otros polímeros, que permiten la administración oral o rectal de los agentes de contraste y principios activos coencapsulados.

Las nanopartículas de oro pueden ser fácilmente derivatizadas como grupo sulfhidrido e incorporar sobre su superficie una gran variedad de reactivos de reconocimiento direccional (anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos...) y agentes de contraste convencionales como Gd(III)DTPA o Gd(III)DOTA.<sup>25</sup>

Los quantum dots son partículas de compuestos semiconductores de tamaño nanométrico y capaces de mantener propiedades cuánticas. La emisión de luz en estas moléculas está claramente relacionada con su tamaño y la naturaleza del semiconductor utilizado.

El descubrimiento de los fulerenos y de los nanotubos de carbono abrió un nuevo horizonte en sus potenciales aplicaciones como andamiaje de

---

<sup>25</sup> Bao, G.; Mitragotri, S.; Tong, S. Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol 15 **2013**, 15, 253-282.

<sup>26</sup> Langereis, S.; Geelen, T.; Grull, H.; Strijkers, G. J.; Nicolay, K. Paramagnetic liposomes for molecular MRI and MRI-guided drug delivery. *Nmr in Biomedicine* **2013**, 26(7), 728-744.

<sup>27</sup> Cheng, Z.; Al Zaki, A.; Hui, J. Z.; Muzykantov, V. R.; Tsourkas, A. Multifunctional Nanoparticles: Cost Versus Benefit of Adding Targeting and Imaging Capabilities. *Science* **2012**, 338(6109), 903-910.

<sup>25</sup> Bao, G.; Mitragotri, S.; Tong, S. Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol 15 **2013**, 15, 253-282.

agentes de contraste. En particular, diversos fulerenos se han utilizado para encapsular Gd(III) manteniendo propiedades de relajación adecuadas: con múltiples ejemplos de empleo de Gadofulerenos como nuevos agentes de contraste.<sup>28,29</sup> Más recientemente, se ha descrito la posibilidad de utilizar nanotubos de carbono conteniendo inclusiones de Gd(III) como agentes de contraste MRI.<sup>30</sup> La versatilidad de estas últimas plataformas las hace ideales para acoplar agentes de contraste direccionales, pues poseen una estructura tubular anisotrópica capaz de ser derivatizada con agentes de contraste paramagnético, u otras moléculas de visualización de imagen multimodal. Más aun, el confinamiento de Gd(III) en nanoestructuras produce incrementos notables en la relajatividad.<sup>30,31</sup> En general el aumento de relajatividad observado en sistemas en los que un quelato de Gd(III) se ha unido a un nanotrasportador es debido a la restringida movilidad rotacional, descrita con el parámetro  $\tau_r$ .<sup>32,33</sup> También se ha descrito el empleo de US-GdSWCNTs (Ultra Short Gd Single Walled Carbon Nanotubes) como sondas sensibles al pH para MRI.<sup>34</sup>

Sin embargo, el desarrollo actual de los nanotubos de carbono como plataforma portadora de agentes de contraste permanece, a pesar de sus innegables ventajas, escasamente desarrollado. Más concretamente resulta necesario ahora caracterizar más sistemáticamente sus propiedades

---

<sup>28</sup> Toth, E.; Bolskar, R. D.; Borel, A.; Gonzalez, G.; Helm, L.; Merbach, A. E.; Sitharaman, B.; Wilson, L. J. Water-soluble gadofullerenes: Toward high-relaxivity, pH-responsive MRI contrast agents. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*(2), 799-805.

<sup>29</sup> Bolskar, R. D. Gadofullerene MRI contrast agents. *Nanomedicine* **2008**, *3*(2), 201-213.

<sup>30</sup> Sitharaman, B.; Kissell, K. R.; Hartman, K. B.; Tran, L. A.; Baiklov, A.; Rusakova, I.; Sun, Y.; Khant, H. A.; Ludtke, S. J.; Chiu, W.; Laus, S.; Toth, E.; Helm, L.; Merbach, A. E.; Wilson, L. J. Superparamagnetic gadonanotubes are high-performance MRI contrast agents. *Chem. Commun.* **2005**, (31), 3915-3917

<sup>31</sup> Ananta, J. S.; Godin, B.; Sethi, R.; Moriggi, L.; Liu, X.; Serda, R. E.; Krishnamurthy, R.; Muthupillai, R.; Bolskar, R. D.; Helm, L.; Ferrari, M.; Wilson, L. J.; Decuzzi, P. Geometrical confinement of gadolinium-based contrast agents in nanoporous particles enhances T-1 contrast. *Nature Nanotechnology* **2010**, *5*(11), 815-821.

<sup>32</sup> Bloembergen, N. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions - Comment. *Journal of Chemical Physics* **1957**, *27*(2), 595-596.

<sup>33</sup> Bloembergen, N.; Morgan, L. O. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions Effects of Electron Spin Relaxation. *Journal of Chemical Physics* **1961**, *34*(3), 842-&.

<sup>34</sup> Hartman, K. B.; Laus, S.; Bolskar, R. D.; Muthupillai, R.; Helm, L.; Toth, E.; Merbach, A. E.; Wilson, L. J. Gadonanotubes as ultrasensitive pH-smart probes for magnetic resonance imaging. *Nano Letters* **2008**, *8*(2), 415-419.

magnéticas, obtener preparaciones de nanotubos solubles en agua y preparar nanotubos conteniendo moléculas óptica o magnéticamente activas como complejos de Gd(III) o moléculas fluorescentes.

Esta Tesis doctoral proporciona solución a muchas de estas necesidades, presentando y caracterizando la primera generación de agentes de contraste nanotubulares conteniendo derivados de Gd(III)DOTAmonoamida acoplados mediante espaciadores de diversa longitud sobre nanotubos de carbono.





## 2. Antecedentes

---

“La domanda che ci assilla è di dove proveniamo e dove andiamo, tutto quello che possiamo osservare da noi stessi è ciò che ci circonda attualmente. È per questo che abbiamo l'ansia di scoprire su di esso quanto più possiamo. Questa è scienza, l'apprendere, il conoscere, questa è la vera sorgente di ogni impresa spirituale umana.”

Erwin Shrödinger, *Cos'è la vita? Scienza e umanesimo*



## 2.1. INTRODUCCIÓN A LA IMAGEN POR RESONANCIA MAGNÉTICA

La Imagen por Resonancia Magnética es una técnica empleada en el diagnóstico clínico<sup>35</sup> que utiliza el fenómeno físico de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para obtener imágenes detalladas de cualquier sección del cuerpo humano. Aunque se trata de una técnica relativamente reciente (descubierta con los primeros experimentos de Lauterbur<sup>5</sup> a principios de los años setenta del pasado siglo XX), se ha convertido en la actualidad en una de las herramientas más poderosas en el diagnóstico clínico<sup>36</sup> compitiendo en condiciones favorables con la Tomografía Axial Computarizada (TAC) y la Radiografía Convencional (RC) por Rayos X, o con las técnicas de Medicina Nuclear (MN) como la Tomografía de Emisión de Positrones (PET) y la Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único (SPECT) y la imagen por ultrasonidos (US).

Las principales ventajas de la MRI son:

- ✓ Ausencia de radiaciones ionizantes. A diferencia del TAC y de los Rayos X la MRI utiliza combinaciones de pulsos de radiofrecuencia y gradientes de campo magnético que, gracias a las bajas energías empleadas, no suponen daño físico alguno para el organismo.
- ✓ Elevada resolución espacial y discriminación tisular. Es posible alcanzar con MRI resoluciones submilimétricas, muy parecidas a las que proporciona la TAC y muy superiores a las obtenidas con las técnicas de medicina nuclear PET y SPECT o los ultrasonidos. La MRI proporciona además un óptimo nivel de discriminación estructural entre los tejidos blandos, que supera con amplitud los resultados de TAC, más favorables en tejidos duros con alta densidad a los RX, como el óseo. Así mismo, la MRI no resulta afectada por las barreras óseas o gaseosas (pulmones), como es el caso de los US.

---

<sup>35</sup> Mansson, S.; BtØrneud, A.; Merbach, A. E.; Toth, E. *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. 2001. Chichester, John Wiley&Sons.

<sup>5</sup> Lauterbur, P. C. Image Formation by Induced Local Interactions - Examples Employing Nuclear Magnetic-Resonance. *Nature* **1973**, *242* (5394), 190-191.

<sup>36</sup> Runge, V. M.; Nelson, K. L. *In Magnetic Resonance Imaging*; St. Louis, **1999**; Vol. 1; 1-257.

✓ Elevada versatilidad en los mecanismos de generación de contraste endógeno y exógeno. Mientras que los RX proporcionan la densidad electrónica y los métodos de MN utilizan la emisión de radiación gamma como única fuente de contraste, la MRI puede utilizar normalmente hasta cinco fuentes de contraste, tres endógenas ( $T_1$ ,  $T_2$  y densidad protónica) y dos instrumentales (TR y TE), generando contraste altamente específico adaptable a cada situación.

✓ Posibilidad de obtener imágenes de diferentes núcleos. En este sentido, la MRI de protón es la más utilizada debido a que el agua es uno de los constituyentes mayoritarios de los tejidos. La abundancia isotópica del  $^1\text{H}$  es próxima al 100% y su relación giromagnética  $\gamma$  es la mayor en comparación con otros. Además, es posible obtener imágenes de otros núcleos, como  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{17}\text{O}$  con utilidad en estudios de funcionalidad cardíaca y oxigenación tumoral o cerebral, entre otros.

Sin embargo, y a pesar de sus ventajas, la utilización de MRI no está libre de limitaciones. Su sensibilidad, en el rango mM constituye sin duda su principal inconveniente en comparación con las técnicas de MN que pueden alcanzar sensibilidades de  $10^{-12}$  M, si bien a expensas de mucha menor resolución espacial.<sup>37</sup> En este contexto, cabe resaltar el reciente desarrollo de técnicas de imagen híbrida PET/MRI que permiten combinar la elevada sensibilidad PET con la mayor resolución y discriminación espacial MRI.<sup>38</sup> En resumen, tomando en consideración sus ventajas e inconvenientes, la MRI actual aparece como un método de diagnóstico no invasivo, muy robusto y extendido, que proporciona y engloba la información que se puede obtener a través de las otras técnicas anteriormente comentadas, complementando muy satisfactoriamente muchas de sus limitaciones.

---

<sup>37</sup> Sartor, K. Diagnostic and Interventional Neuroradiology: A Multimodality Approach. 2003.p 35 Stuttgart, Thieme. Ref Type: Edited Book

<sup>38</sup> Ratib, O.; Beyer, T. Whole-body hybrid PET/MRI: ready for clinical use? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2011**, *38* (6), 992-995.

Los principales determinantes del contraste MRI endógeno son los tiempos de relajación magnética longitudinal y transversal,  $T_1$ , y  $T_2$  y la densidad de los protones del agua en los distintos volúmenes de la muestra (voxels) que originan diferencias de intensidad en los elementos correspondientes de la imagen (pixels).<sup>39</sup>

A pesar de que el elevado contraste endógeno MRI no hacía previsible, al principio, la necesidad de incrementarlo con agentes exógenos, la expansión de la MRI ha originado, en paralelo, el desarrollo de una nueva clase de productos farmacéuticos: los Agentes de Contraste (ACs).<sup>35</sup> Los ACs son sustancias capaces de producir un incremento local en la intensidad de la imagen ( $\Delta_c$ ) que puede expresarse como:

$$\Delta_c = I_{pre} - I_{post} \approx \bar{I}_{pre} - \bar{I}_{post} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Dónde:  $I_{pre}$  es la intensidad del pixel, o del conjunto de pixeles considerados, antes de la administración del AC e  $I_{post}$  es la intensidad del mismo píxel o pixeles, después de la acción del AC.<sup>40</sup>

Existen dos tipos principales de ACs paramagnéticos (o superparamagnéticos) y diamagnéticos. Los agentes paramagnéticos, como son los complejos de un metal paramagnético y un ligando orgánico, originan  $\Delta_c$  en imágenes MRI, mediante la disminución local de los tiempos de relajación del agua de los tejidos donde se acumulan. Entre ellos destacan los complejos de  $Gd(III)$ <sup>8</sup> o las partículas superparamagnéticas de  $Fe_2O_3$ .<sup>12</sup> Los agentes diamagnéticos originan  $\Delta_c$  en imágenes

<sup>39</sup> Koenig, S. H.; Brown, R. D.; Adams, D.; Emerson, D.; Harrison, C. G. *Invest. Radiol.* **1984**, (19), 76.

<sup>35</sup> Mansson, S.; Btørneud, A.; Merbach, A. E.; Toth, E. *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. 2001. Chichester, John Wiley&Sons

<sup>40</sup> Pacheco-Torres, J.; Calle, D.; Lizarbe, B.; Negri, V.; Ubide, C.; Fayos, R.; Lopez Larrubia, P.; Ballesteros, P.; Cerdan, S. Environmentally Sensitive Paramagnetic and Diamagnetic Contrast Agents for Nuclear Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2011**, 11 (1), 115-130.

<sup>8</sup> Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chemical Reviews* **1999**, 99 (9), 2293-2352.

<sup>12</sup> Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Elst, L. V.; Muller, R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical

espectroscópicas mediante la aparición de una nueva resonancia derivada de la sonda exógenas utilizada,<sup>40</sup> como las sondas funcionales de pH,<sup>41</sup> los indicadores de tensión de oxígeno<sup>42</sup> o más recientemente los compuestos <sup>13</sup>C hiperpolarizados.<sup>43</sup> El contraste inducido por transferencia de magnetización (CEST) puede considerarse intermedio, pues aunque visualiza los intercambios químicos del agua (diamagnética) entre las fases “libre” y “ligada” del agua, utiliza complejos de Gd(III) u otros metales paramagnéticos (PARACEST), para aumentar la sensibilidad y especificidad de estos intercambios.<sup>18</sup>

## 2.2. AGENTES DE CONTRASTE PARA MRI

En la actualidad existen aproximadamente unos 20.000 instrumentos MRI en el mundo, que realizan unos 50 millones de exploraciones anuales.<sup>44</sup> Aproximadamente un tercio de éstas utiliza ACs, lo que proporciona un mercado muy atractivo para la industria farmacéutica. Sin embargo, los ACs comercializados actualmente pertenecen aún a la primera generación, patentados desde principios de los años 80 del pasado siglo, lo que abre numerosas oportunidades para su renovación y mejora en un futuro próximo. Esta tesis proporciona algunos ejemplos en esa dirección.

---

characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (6), 2064-2110.

<sup>40</sup> Pacheco-Torres, J.; Calle, D.; Lizarbe, B.; Negri, V.; Ubide, C.; Fayos, R.; Lopez Larrubia, P.; Ballesteros, P.; Cerdan, S. Environmentally Sensitive Paramagnetic and Diamagnetic Contrast Agents for Nuclear Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2011**, *11* (1), 115-130.

<sup>41</sup> Perez-Mayoral, E.; Negri, V.; Soler-Padros, J.; Cerdan, S.; Ballesteros, P. Chemistry of paramagnetic and diamagnetic contrast agents for Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy pH responsive contrast agents. *European Journal of Radiology* **2008**, *67* (3), 453-458.

<sup>42</sup> Pacheco-Torres, J.; Lopez-Larrubia, P.; Ballesteros, P.; Cerdan, S. Imaging tumor hypoxia by Magnetic Resonance methods. *Nmr in Biomedicine* **2011**, *24* (1), 1-16.

<sup>43</sup> Viale, A.; Aime, S. Current concepts on hyperpolarized molecules in MRI. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *14* (1), 90-96

<sup>18</sup> Terreno, E.; Castelli, D. D.; Aime, S. Encoding the frequency dependence in MRI contrast media: the emerging class of CEST agents. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2010**, *5* (2), 78-98.

<sup>44</sup> Merbach, A. S.; Helm, L.; Toth, E. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging, 2nd Edition. 2013. Wiley.

En las siguientes secciones describiremos brevemente las características generales de los ACs más utilizados en la actualidad (primera generación), los fundamentos físico-químicos del contraste paramagnético y la puesta en funcionamiento de la segunda generación de ACs con aplicaciones en imagen molecular

### 2.2.1. Características generales de los ACs paramagnéticos

Los agentes de contraste paramagnéticos, también llamados medios de contraste, deben reunir las siguientes propiedades:

1. Fácil preparación y conservación. Debido a las elevadas dosis empleadas (en torno a 0.5 M) es conveniente una síntesis eficaz y una estabilidad elevada de la formulación.
2. Biocompatibilidad y toxicidad reducida o nula.
3. Estabilidad *in vivo* de la especie paramagnética. El complejo debe mostrar una elevadísima constante de estabilidad para el metal paramagnético para evitar posibles fenómenos de transmetalación *in vivo*, que podrían desencadenar una respuesta tóxica.
4. Disminución eficaz de los tiempos de relajación magnética  $T_{1(2)}$ . Es importante lograr estas disminuciones con la mínima cantidad de agente de contraste por lo que su relajatividad debe ser lo más elevada posible.
5. Rápida eliminación una vez terminado el análisis. En concreto se recomienda la eliminación de más de un 95% de AC, después de 24h de su administración, para evitar retenciones del AC en el organismo que podrían originar toxicidad crónica por acumulación.



### 2.2.2. Clasificación de los ACs

Los ACs se pueden clasificar dentro de tres grandes grupos según sus propiedades magnéticas, su biodistribución y el contraste que originan en la imagen (Tabla 2.1).

*En función de sus propiedades magnéticas:*

Paramagnéticos: generalmente son complejos de metales paramagnéticos. Los metales más estudiados son el gadolinio Gd(III), el manganeso Mn(II) y el disprosio Dy(III).

Superparamagnéticos: constituidos fundamentalmente por un núcleo de materiales superparamagnéticos, principalmente los óxidos de hierro magnetita o maghemita, recubiertos con derivados de dextrano u otros polímeros estabilizantes.

*En función de su biodistribución:*

Extracelulares: estos ACs son compuestos de reducido peso molecular, que pasan rápidamente de la sangre al intersticio, distribuyéndose en espacio extracelular, con un tiempo de distribución de unos cinco minutos. Se excretan por vía renal en unos ochenta minutos y se utilizan principalmente para evidenciar neuro-patologías cerebrales y la capacidad de perfusión del sistema circulatorio.

Intravasculares: son complejos de gadolinio o micropartículas de hierro de mayor peso molecular que los ACs extracelulares, y por lo tanto, con un tiempo de residencia vascular superior. Se emplean para la visualización del sistema circulatorio mediante angiografía.

Específicos de órganos: realzan el contraste de la imagen RM de un órgano concreto. Los óxidos de hierro y algunos complejos de metales paramagnéticos se pueden considerar como ACs específicos porque se eliminan por vía hepática o renal, resaltando las estructuras anatómicas de estos órganos.

*En función de la imagen:*

Positivos: son aquellos ACs que tienen un efecto de reducción sobre  $T_1$ , originando incrementos en la intensidad de imagen, en lo que se conoce como imágenes blancas.

Negativos: afectan sobre todo a  $T_2$  de los tejidos y dan lugar a descensos en la intensidad de imagen, en lo que se conoce como imágenes oscuras.

En el primer caso se encuentran los complejos paramagnéticos de Gd(III) mientras que como ACs negativos se consideran fundamentalmente las nanopartículas de hierro.

**Tabla 2.1.** Clasificación ACs

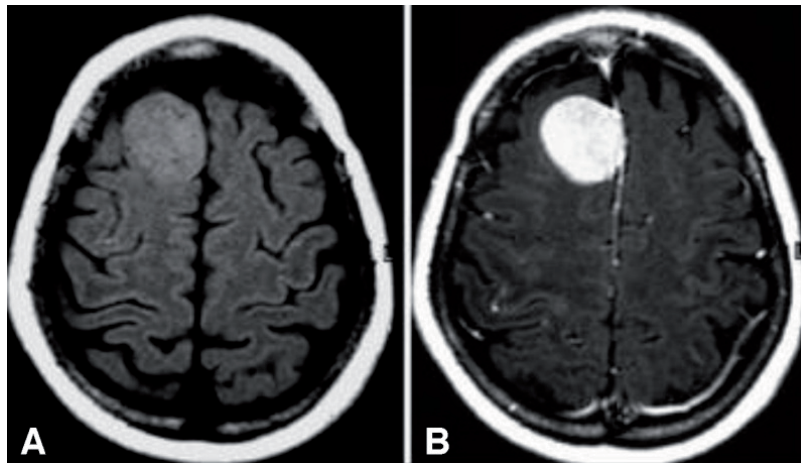
Propiedades Magnéticas	Paramagnéticos (Gd (III), Mn(II) Dy(III)) Superparamagnéticos	SPIOs y USPIOs* (nanopartículas de $Fe_2O_3$ recubiertas de dextrano y dextrano)	
Biodistribución	Extracelulares (Gd(III))	Intravasculares (Macromoleculares)	Específicos de tejidos
Contraste originado en la Imagen	Positivos ( $T_1$ )	Negativos ( $T_2$ )	

\* SPIOs: Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro pequeñas (diámetro medio  $>50$  nm)<sup>44</sup>

USPIOs: Partículas superparamagnéticas de óxido de hierro ultra pequeñas (diámetro medio  $< 50$  nm)<sup>44</sup>

Además de esta clasificación existen otros ACs basados en propiedades fisiológicas, diferentes en tejidos sanos o patológicos, como por ejemplo las sondas funcionales de pH, los indicadores de tensión de oxígeno, o los agentes de contraste de expresión génica. A continuación se muestran algunos ejemplos.

<sup>44</sup> Merbach, A. S.; Helm, L.; Toth, E. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging, 2nd Edition. 2013. Wiley.



**Figura 2.1.** MRI de un meningioma antes (A) y después (B) de la administración de un AC.<sup>45</sup>

La Figura 2.1 ilustra la discriminación clara de un tumor cerebral, más concretamente de un meningioma, mediante la utilización de un agente de contraste positivo. Los agentes de contraste convencionales no pasan la barrera hematoencefálica, pero si permean (en muchos casos) la microvasculatura tumoral que no la posee o se extravasan en aquellas regiones en que la barrera hematoencefálica está rota, como en los episodios isquémicos o algunos eventos neurodegenerativos. Debido a esto, las lesiones cerebrales aparecen como regiones más “blancas” o brillantes que el resto del tejido cerebral.

### 2.2.3. Teoría de la relajatividad (Solomon-Bløembergen-Morgan)

Son muchos los estudios publicados en la literatura para describir el efecto derivado de la presencia de un soluto paramagnético sobre el tiempo de relajación de los protones de un disolvente, particularmente en el caso de disoluciones acuosas. Ninguna de estas teorías ofrece una interpretación precisa y cuantitativa del contraste, teniendo en cuenta la complejidad de las interacciones que tienen lugar, pero sin embargo

<sup>45</sup> Pereira Pinto Gama, H.; da Rocha, A. J.; da Silva, C. J.; Mendes, M. F.; Esteves Veiga, J. C.; Penteado Lancellotti, C. L.; Piana Andrade, V.; Tilbery, C. P. Meningioma growth during interferon beta-1a treatment for multiple sclerosis. *Arquivos de Neuropsiquiatria* **2008**, 66 (2-B), 402-404.

permiten elaborar un marco conceptual adecuado para la interpretación del fenómeno. La teoría general de la relajación nuclear de un disolvente en presencia de un soluto paramagnético fue desarrollada por los grupos de Solomon, Bloembergen y Morgan (SBM).<sup>32,33,46</sup>

Brevemente, la adición de un soluto paramagnético a una disolución acuosa provoca un incremento en la velocidad de relajación longitudinal y transversal de los protones del agua. Así, la velocidad de relajación observada de un núcleo  $1/T_{1(2)obs}$ , se define como la suma de una contribución diamagnética  $1/T_{1(2)D}$ , y una contribución paramagnética,  $1/T_{1(2)P}$  de acuerdo con la Ecuación. 2.2

$$\frac{1}{T_{1(2)obs}} = \frac{1}{T_{1(2)D}} + \frac{1}{T_{1(2)P}} \quad \text{Ecuación. 2.2}$$

El término diamagnético es la velocidad de relajación del núcleo del disolvente en ausencia de un soluto paramagnético, mientras que la contribución paramagnética se corresponde con la velocidad de relajación del núcleo en presencia de la especie paramagnética. La relajación en disoluciones diluidas del soluto paramagnético, en las que las interacciones soluto-soluto están minimizadas, depende linealmente de la concentración de la especie paramagnética en disolución (Ecuación 2.3):

$$\frac{1}{T_{i(P)}} = r_i [M], i = 1,2 \quad \text{Ecuación 2.3}$$

donde,  $[M]$  es la concentración (en mmol/L) de la especie paramagnética y la constante de proporcionalidad  $r_i$ , se llama *relajatividad molar* y se mide en  $s^{-1}mM^{-1}$ .

Si se considera la relajación de los protones del agua, fundamento de la MRI, se introduce el concepto de *relajatividad protónica*. Así, la relajatividad

<sup>32</sup> Solomon, I. Relaxation Processes in A System of 2 Spins. *Physical Review* **1955**, 99 (2), 559-565.

<sup>33</sup> Bloembergen, N. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions - Comment. *Journal of Chemical Physics* **1957**, 27(2), 595-596.

<sup>46</sup> Bloembergen, N.; Morgan, L. O. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions Effects of Electron Spin Relaxation. *Journal of Chemical Physics* **1961**, 34 (3), 842-850.

protónica es la capacidad que posee una sustancia paramagnética para aumentar la velocidad de relajación de los protones del agua y se interpreta como una medida de su eficacia como AC.

La relajatividad se define, según la teoría de SBM en función de distintos parámetros físico-químicos relacionados entre sí. En el caso de los complejos de metales paramagnéticos, los ACs más utilizados, algunos de estos parámetros se pueden regular influyendo sobre la estructura del ligando.

Los parámetros más importantes que gobiernan el comportamiento de los ACs paramagnéticos en disolución quedan reflejados en las ecuaciones de SBM abreviadas:

$$T_{1(2)} = \frac{q}{55.5 (T_M + \tau_M)} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

$$\frac{1}{T_m} = \frac{K}{r^6} f(\tau_c) \quad \text{Ecuación 2.5}$$

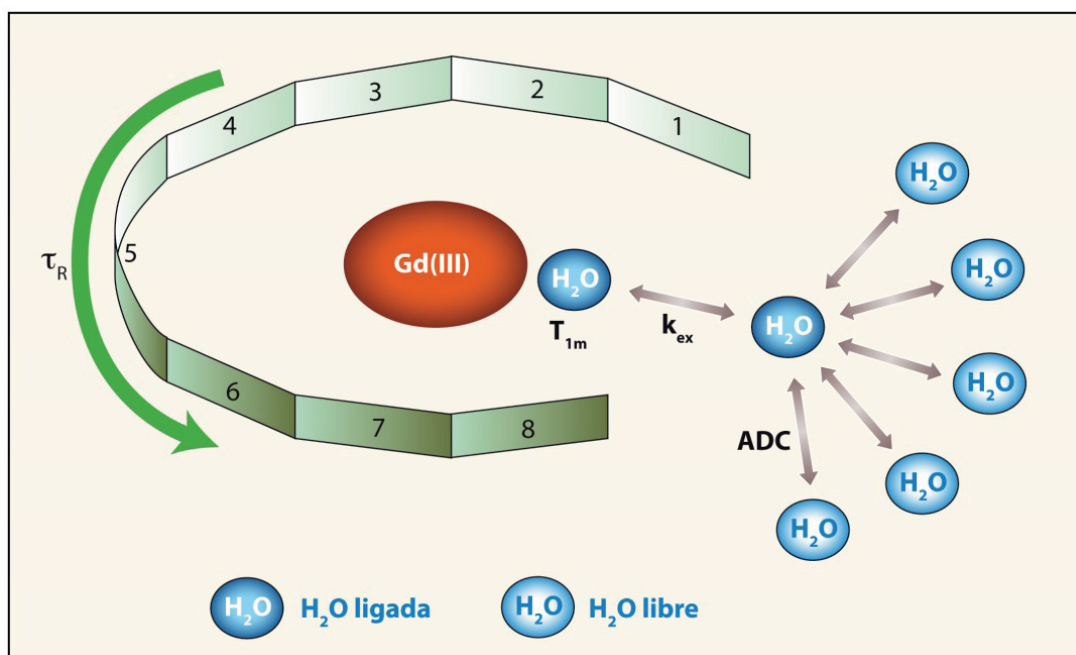
$$\tau_c^{-1} = \tau_r^{-1} + \tau_s^{-1} + \tau_m^{-1} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

donde,  $T_{1(2)}$ , es la relajatividad longitudinal (transversal),  $q$  el número de hidratación del complejo,  $T_M$  tiempo de relajación de la molécula de  $H_2O$  directamente ligada al metal,  $\tau_M$  el tiempo de residencia de la molécula de  $H_2O$  en la primera esfera de coordinación del metal, y  $r$  la distancia comprendida entre los protones de la molécula de agua y el metal,  $\tau_c$  el tiempo de correlación efectivo,  $\tau_R$  el tiempo de correlación rotacional, y por último,  $\tau_s$ , tiempo de correlación electrónico.

En resumen, la  $r_{1(2)}$  depende de  $q$ , del tiempo de residencia de la molécula de  $H_2O$  directamente unida al metal  $\tau_M$ , de la distancia de esta al centro metálico y es función además, del tiempo de correlación efectivo  $\tau_c$ , que a su vez depende del tiempo de relajación electrónico del centro metálico  $\tau_s$ , y del tiempo de correlación rotacional  $\tau_c$ , éste último relacionado con el movimiento del complejo en disolución.

Así pues, la investigación actual dentro de este campo está centrada en el diseño y desarrollo de nuevos ACs con propiedades mejoradas por modificación de estos parámetros como predice la teoría de SBM.<sup>47</sup>

En la Figura 2.2<sup>40</sup> se resume gráficamente la interacción de un AC paramagnético, concretamente un complejo de gadolinio en disolución acuosa.



**Figura 2.2.** Representación de un complejo de Gd(III) con una molécula de agua en su primera esfera de coordinación en disolución acuosa.<sup>40</sup>

Un complejo paramagnético en disolución, es un sistema dinámico que puede considerarse compuesto por dos esferas de coordinación. La *esfera de coordinación interna* que contiene a las moléculas de agua en contacto directo con el centro metálico y que interaccionan con el spin electrónico del metal mediante un proceso de intercambio de magnetización electrón-núcleo; y la *esfera de coordinación externa*, constituida por el resto de las moléculas de agua en la disolución. Existe un intercambio de moléculas de

<sup>47</sup> Terreno, E.; Delli Castelli, D.; Viale, A.; Aime, S. Challenges for Molecular Magnetic Resonance Imaging. *Chemical Reviews* **2010**, *110* (5), 3019-3042.

<sup>40</sup> Pacheco-Torres, J.; Calle, D.; Lizarbe, B.; Negri, V.; Ubide, C.; Fayos, R.; Lopez Larrubia, P.; Ballesteros, P.; Cerdan, S. Environmentally Sensitive Paramagnetic and Diamagnetic Contrast Agents for Nuclear Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2011**, *11* (1), 115-130.

agua entre las esferas de coordinación, que depende de la difusión browniana del agua, caracterizada por su coeficiente de difusión ADC.

Aquellas moléculas de agua que no interaccionan directamente con el complejo paramagnético se las conoce con el nombre de *segunda esfera de coordinación* del metal. Así pues, la relajatividad  $R_{1(2)}$  es la suma de tres contribuciones:

$$R_{1(2)} = r_{1(2)}^{JS} + r_{1(2)}^{SS} + r_{1(2)}^{OS} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

en donde,  $r_{1(2)}^{JS}$  es la relajatividad inducida por la primera esfera de coordinación del metal,  $r_{1(2)}^{SS}$ , referida a la segunda esfera de coordinación y  $r_{1(2)}^{OS}$  es la contribución del resto de las moléculas de agua que rodean al complejo (Ecuación 2.7).

Para sistemas de grandes dimensiones, como las macromoléculas, las proteínas,<sup>48</sup> los polisacáridos<sup>49</sup> que prevén movimientos lentos, la teoría de la relajatividad de SBM tiene sus limitaciones y en estos casos hay que incorporar a la SBM el “modelo libre” descrito por Lipari-Szabo<sup>50</sup> que tiene en cuenta tanto la rotación más rápida de los quelatos como del movimiento global del sistema, introduciendo dos nuevos parámetros  $\tau_l$  que describe el movimiento local del complejo y  $\tau_g$  que describe el movimiento global, parámetro que en la SBM es sustituido por  $\tau_r$ .

#### 2.2.4. Agentes de Contraste Paramagnéticos

Los ACs paramagnéticos son sustancias que permiten modificar los valores de relajatividad longitudinal ( $r_1 = 1/T_1$ ), transversal ( $r_2 = 1/T_2$ ,  $r_2^* =$

<sup>48</sup> Kemple, M. D.; Buckley, P.; Yuan, P.; Prendergast, F. G. Main chain and side chain dynamics of peptides in liquid solution from C-13 NMR: Melittin as a model peptide. *Biochemistry* **1997**, 36(7), 1678-1688.

<sup>49</sup> Maler, L.; Widmalm, G.; Kowalewski, J. Motional properties of a pentasaccharide containing a 2,6-branched mannose residue as studied by C-13 nuclear spin relaxation. *Journal of Biomolecular Nmr* **1996**, 7(1), 1-7.

<sup>50</sup> Lipari, G.; Szabo, A. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .1. Theory and Range of Validity. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, 104(17), 4546-4559.

$1/T_2^*$ ) del agua de los tejidos.<sup>51</sup> Entre los ACs paramagnéticos es posible establecer tres categorías diferentes de sustancias que se emplean en los diferentes tipos de contrastes para MRI:

- ✓ Radicales libres orgánicos
- ✓ Sales de metales paramagnéticos
- ✓ Complejos de metales paramagnéticos.

En la presente memoria trataremos los dos últimos casos, poniendo especial énfasis en el diseño y desarrollo de nuevos complejos de metales paramagnéticos.

#### 2.2.4.1. Complejos de metales paramagnéticos

Generalmente, los ACs más estudiados son los complejos de metales paramagnéticos y más concretamente de lantánidos, derivados de ácidos poliaminopolicarboxílicos. La complejación del centro metálico modifica sensiblemente su comportamiento químico, manteniendo relativamente inalteradas sus propiedades magnéticas. Los metales paramagnéticos son muy tóxicos y no pueden administrarse en forma libre o de sus correspondientes sales, siendo absolutamente necesaria la complejación de los mismos con un ligando orgánico para reducir su toxicidad.

El Gd(III) es el lantánido que ha despertado mayor interés debido a sus propiedades; posee un elevado paramagnetismo, debido a la presencia de 7 electrones desapareados en sus orbitales f, un  $\tau_s$  relativamente grande que favorece una interacción prolongada con la molécula de agua ligada, un alto momento magnético y una esfera de hidratación relativamente lábil. Sin embargo, como ya se ha comentado, el Gd(III) es un metal muy tóxico por lo que su empleo como AC queda reducido a sus correspondientes complejos.

---

<sup>51</sup> Calamante, F.; Gadian, D. G.; Connelly, A. Quantification of perfusion using bolus tracking magnetic resonance imaging in stroke: assumptions, limitations, and potential implications for clinical use. *Stroke* **2002**, 33(4), 1146-1151.



La primera generación de ACs para MRI fueron complejos de Gd(III), derivados de ácido etilentriaminopentaacético [(DTPA(Gd)(H<sub>2</sub>O)<sup>2-</sup>)] (1) o del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético [(DOTA(Gd)(H<sub>2</sub>O)<sup>-</sup>)] (2).

**Tabla 2.2.** Complejos de Gd (III) empleados en el diagnóstico clínico<sup>8</sup>

Nombre químico	Nombre Comercial	Compañía	Clasificación
[Gd(DTPA)(H <sub>2</sub> O)] <sup>2-</sup>	Magnevist®	Schering (Alemania)	Extracelular
[Gd(DOTA)(H <sub>2</sub> O)] <sup>-</sup>	Dotarem®	Guerbet (Francia)	Extracelular
[Gd(DTPA-BMA)(H <sub>2</sub> O)]	Omniscan®	Nycomed-Amersham (UK)	Extracelular
[Gd(HP-DO3A)(H <sub>2</sub> O)]	Prohance®	Bracco (Italia)	Extracelular
[Gd(DO3A-butrol)(H <sub>2</sub> O)]	Gadovist®	Schering (Alemania)	Extracelular
[Gd(DTPA-BMEA)(H <sub>2</sub> O)]	OptiMARK®	Mallinckrodt (USA)	Extracelular
[Gd(BOPTA)(H <sub>2</sub> O)] <sup>2-</sup>	Multihance®	Bracco (Italia)	Hepatobiliar-extracelular
MS-325-L	Angiomark®	Epix (USA)	Angiográfico

En la Tabla 2.2 se resumen algunos de los ACs para MRI aprobados, atendiendo a su nombre comercial y su clasificación. El complejo de gadolinio [(DTPA(Gd)(H<sub>2</sub>O)<sup>2-</sup>)] (1) fue el primer AC aprobado por las agencias de seguridad farmacéutica y patentado como Magnevist® por la compañía Schering (Alemania).<sup>7</sup>

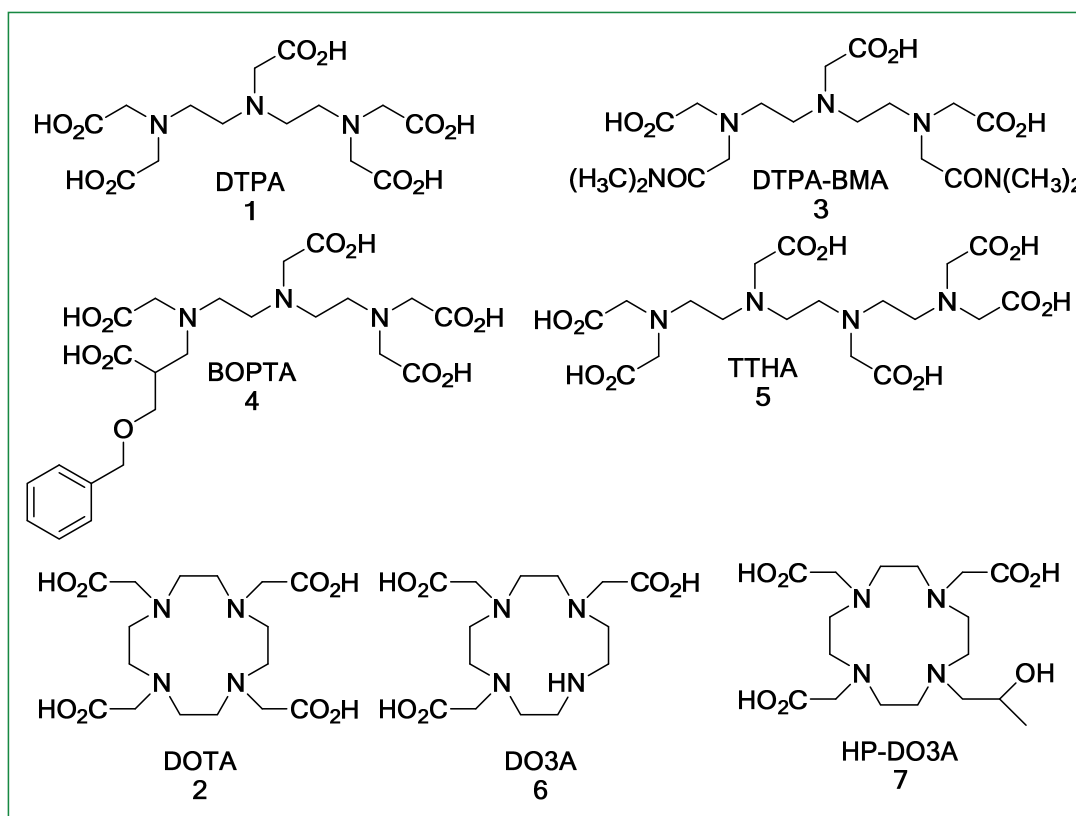
La Figura 2.3 presenta alguno de los ligandos acíclicos y macrocíclicos (1-7) empleados en la formación de ACs paramagnéticos. El complejo (NMG)<sub>2</sub>[Gd (DTPA)], donde NMG=N-metilglucosamina, se ha empleado constantemente en análisis clínico y se sigue utilizando gracias a su buena estabilidad y baja toxicidad. Distintas modificaciones en la estructura de DTPA, han dado lugar a otros ACs con propiedades diferentes (Figura 2.3).

<sup>8</sup> Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chemical Reviews* **1999**, *99* (9), 2293-2352.

<sup>7</sup> Gries, H. D.; Rosenberg, D. D.; Weinmann, H. J. D. Paramagnetische komplexsalze, deren herstellung und verwendung bei der nmr-diagnostik. DE3129906 A1, Feb 10, 1983.

Así el complejo de Gd(III) conocido como BOPTA (ácido benciloximetilentriaminopentaacético) (4) presenta una mayor lipofilia que garantiza una mejor eliminación a través el hígado y las vías biliares, permitiendo la investigación MRI de estos órganos, difícilmente observables mediante el empleo de ACs hidrofílicos, que se excretan a través de los riñones.

El ligando acíclico TTHA (ácido trietilentetraminohexaacético) (5), forma complejos nonacoordinados con el ion Gd(III) dando lugar a un complejo termodinámicamente más estable. Este complejo presenta  $q = 0$ , por lo que se emplea normalmente para el estudio de la segunda esfera de coordinación.



**Figura 2.3.** Ligandos acíclicos y ligandos macrocíclicos. El nombre I.U.P.A.C. para estos compuestos macrocíclicos suele ser muy largo, por esta razón se conocen por su nombre trivial.<sup>52</sup>

<sup>52</sup> Ballesteros, P.; Soriano, E.; Pérez-Mayoral, E.; García-Amo, M.; Cerdán, S. Flexible tetraazamacrocycles as metal ligands. Their relevance in magnetic resonance imaging. *Research Signpost, Structural Analysis of Cyclic Systems* 2005.

En general, los complejos de ligandos acíclicos tienen una estabilidad cinética relativamente baja; si se aumenta su tiempo de residencia en el organismo se observa una liberación lenta y gradual del metal. Por el contrario, los ligandos macrocíclicos normalmente presentan una constante de afinidad por el metal muy superior, lo que permite superar este inconveniente. Así, el complejo (NMG)[Gd(DOTA)], (DOTA = ácido 1,4,7,10-tetrazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacético) conjuga una elevada estabilidad, elevada relajatividad junto con su una baja toxicidad, lo que le convierte en AC óptimo para su utilización en el diagnóstico clínico. La estabilidad es tal que, la eliminación de uno de los grupos acetato en el complejo [Gd(DOTA)] (2) da lugar a un complejo todavía lo suficientemente estable (Gd(DO3A)) (6). Como puede observarse en la **Tabla 2.3** el complejo [Gd(DOTA)] (2) presenta una constante de afinidad de 24.6, superior a la del complejo lineal [Gd(DTPA)] (1).

**Tabla 2.3.** Constantes de afinidad  $K_f$  de algunos ACs<sup>8</sup>

Complejo	[Gd(DTPA)]	[Gd(DOTA)]	[Gd(DO3A)]	[Gd(PCTA-12)]
Log $K_f$	22.5	24.6	21.1	22.5

Además, el ligando DO3A (6) se considera un excelente producto de partida para la síntesis de nuevos ACs macrocíclicos permitiendo la funcionalización de uno de los nitrógenos amínicos.

La investigación en este campo está en continuo desarrollo. En los últimos veinte años se han publicado numerosos artículos en relación con el estudio de la estructura y dinámica de los complejos de Gd(III), lo que ha supuesto un gran avance en la comprensión de los parámetros estructurales y electrónicos determinantes de la relajatividad de los mismos.

Nuestro grupo de investigación ha contribuido activamente a este progreso desde hace más de una década, mediante la preparación de ácidos *N*-2-azol-1(2)etiliminodiacéticos 8-11, unas nuevas complexonas de

<sup>8</sup> Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chemical Reviews* **1999**, *99* (9), 2293-2352.

naturaleza heterocíclica que presentan valores muy elevados de relajatividad  $r_{1(2)}$  (Figura 2.4).<sup>53</sup>

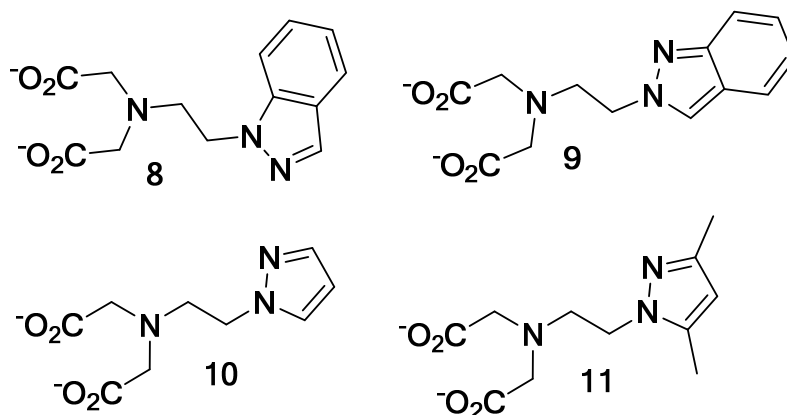
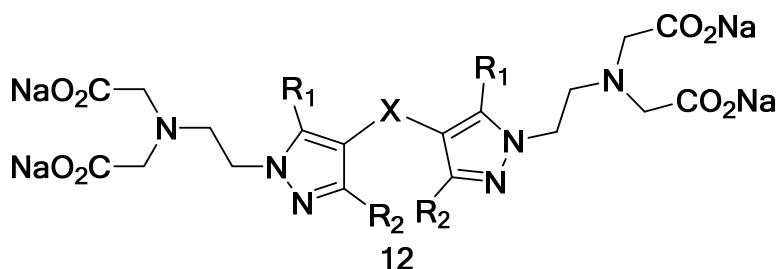


Figura 2.4. Ligandos monoméricos heterocíclicos complejantes de Gd(III).

Sin embargo, la capacidad complejante para Gd(III) de estos compuestos no resultaba lo suficientemente elevada como para permitir su utilización en clínica. Con objeto de mejorar este aspecto, se sintetizaron los compuestos con estructura bi- o bis-azólica<sup>54</sup> (Figura 2.5).



12a  $R_1 = R_2 = \text{Me}$ ;  $X = \text{CH}_2\text{OCH}_2$

12b  $R_1 = \text{Me}$ ;  $R_2 = \text{Ph}$ ;  $X = \text{CH}_2\text{OCH}_2$

12c  $R_1 = \text{Me}$ ;  $R_2 = \text{Ph}$ ;  $X = \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$

12d  $R_1 = \text{Me}$ ;  $R_2 = \text{Ph}$ ;  $X = \text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2$

12e  $R_1 = \text{Me}$ ;  $R_2 = \text{Ph}$ ;  $X = \text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OCH}_2$

Figura 2.5. Complexonas con estructura de bi y bis-pirazol.

<sup>53</sup> Lopez, P.; Seipelt, C. G.; Merklings, P.; Sturz, L.; Alvarez, J.; Dolle, A.; Zeidler, M. D.; Cerdan, S.; Ballesteros, P. N-2-(azol-1(2)-yl)ethyliminodiacetic acids: A novel series of Gd(III) chelators as T-2 relaxation agents for magnetic resonance imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, 7(3), 517-527.

<sup>54</sup> Mayoral, E. P.; Garcia-Amo, M.; Lopez, P.; Soriano, E.; Cerdan, S.; Ballesteros, P. A novel series of complexones with bis- or biazole structure as mixed ligands of paramagnetic contrast agents for MRI. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, 11 (24), 5555-5567.

Los complejos de Gd(III) presentaron relajatividades en  $r_{1(2)}$  cuatro veces superiores a los complejos tradicionales empleados en clínica derivados de DTPA (1) o DOTA (2). Sin embargo las constantes de estabilidad de los correspondientes complejos de Gd(III) resultaron muy inferiores a las de DOTA (2) y DTPA (1), limitando así su aplicación clínica.

Los complejos 12 (a-e) presentaron unos valores de  $r_{1(2)}$  muy superiores a los descritos para complejos de bajo peso molecular. En principio esta mejora en las propiedades de relajación podría deberse, además que por un alto  $q$ , a algún tipo de asociación entre los complejos y o a la incorporación de azoles en la estructura de estos ligandos. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se prepararon los complejos de Gd(III) de los ligandos 13 (a-d) y 14 (a-b), derivados de DTPA y DOTA respectivamente (Figura 2.6).<sup>55, 56</sup>

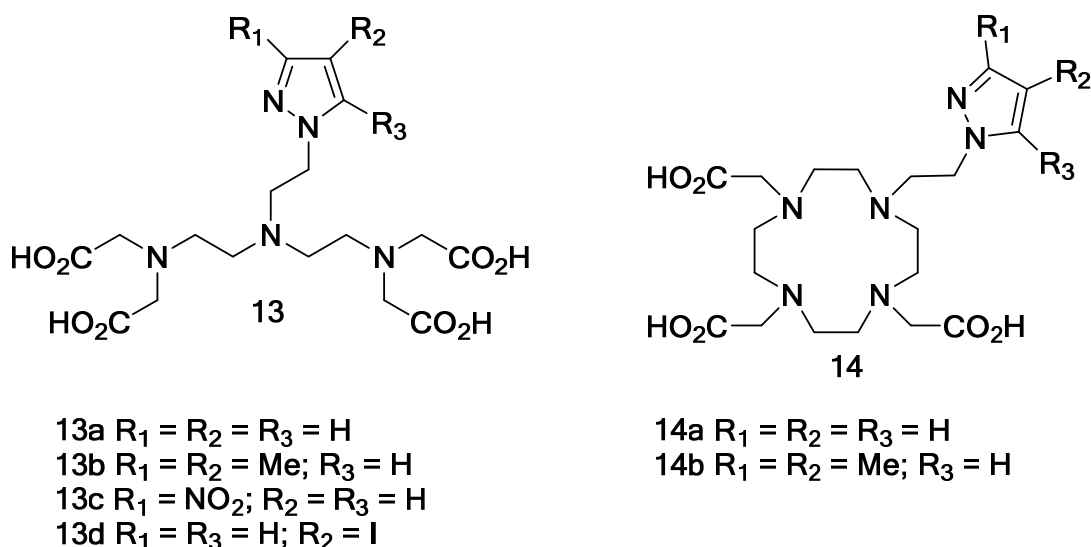


Figura 2.6. Ligandos de DTPA y DOTA con estructura pirazólica.

Los complejos de Gd(III) de 13, 14 presentaron unos valores de  $r_{1(2)}$  ligeramente superiores a DTPA y DOTA tomados como compuestos de

<sup>55</sup> Ballesteros, G. P.; Perez, M. E. New 1-pyrazolyethyl-tris(carboxymethyl)-azacyclododecane derivatives, useful for preparing paramagnetic complexes for use as contrast agents in diagnostic magnetic resonance imaging. WO2006051142-A1.

<sup>56</sup> Perez-Mayoral, E.; Soriano, E.; Cerdan, S.; Ballesteros, P. Experimental and theoretical study of lanthanide complexes based on linear and macrocyclic polyaminopolycarboxylic acids containing pyrazolyethyl arms. *Molecules* **2006**, *11* (5), 345-356.

referencia. Sin embargo, la presencia del azol afecta a la complejación con el ion Gd(III) disminuyendo la constante de estabilidad de estos complejos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la elevada  $r_{1(2)}$  para los complejos de Gd(III) 13 y 14, se puede atribuir, además que por un elevado  $q$ , a algún tipo de interacción entre los complejos probablemente en la que intervienen los núcleos azólicos.

## 2.2.5. Agentes de contraste de segunda generación.

### Imagen Molecular

Una segunda generación de ACs está constituida por moléculas con mayor especificidad, capaces de detectar procesos fundamentales en biología celular y molecular, en lo que se conoce actualmente como imagen molecular.<sup>57</sup> Este tipo de imagen emplea ACs paramagnéticos o superparamagnéticos inmunodirigidos, que permiten la detección *in vivo* de receptores, antígenos o moléculas de la matriz extracelular o incluso proteínas o ácidos nucleicos intracelulares. En general, el abordaje se basa en acoplar un marcador magnético o superparamagnético al anticuerpo o molécula de reconocimiento de la diana, de manera que se permita su detección mediante MRI.<sup>57</sup> En particular, se han desarrollado distintos ACs selectivos para la detección de la molécula de adhesión intracelular ICAM,<sup>58</sup> E-selectina,<sup>59</sup> las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  o  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,<sup>60,61</sup> y la fibrina.<sup>62,63</sup> Otros

<sup>57</sup> Basilion, J. P.; Yeon, S.; Botnar, R. Magnetic resonance imaging: Utility as a molecular imaging modality. *Current Topics in Developmental Biology, Volume 70* **2005**, 70, 1-33.

<sup>58</sup> Sipkins, D. A.; Gijbels, K.; Tropper, F. D.; Bednarski, M.; Li, K. C. P.; Steinman, L. ICAM-1 expression in autoimmune encephalitis visualized using magnetic resonance imaging. *Journal of Neuroimmunology* **2000**, 104 (1), 1-9.

<sup>59</sup> Sibson, N. R.; Blamire, A. M.; Bernades-Silva, M.; Laurent, S.; Boutry, S.; Muller, R. N.; Styles, P.; Anthony, D. C. MRI detection of early endothelial activation in brain inflammation. *Magnetic Resonance in Medicine* **2004**, 51 (2), 248-252.

<sup>60</sup> Anderson, S. A.; Rader, R. K.; Westlin, W. F.; Null, C.; Jackson, D.; Lanza, C. M.; Wickline, S. A.; Kotyk, J. J. Magnetic resonance contrast enhancement of neovasculature with alpha(v)beta(3)-targeted nanoparticles. *Magnetic Resonance in Medicine* **2000**, 44 (3), 433-439.

<sup>61</sup> Winter, P. M.; Morawski, A. M.; Caruthers, S. D.; Fuhrhop, R. W.; Zhang, H. Y.; Williams, T. A.; Allen, J. S.; Lacy, E. K.; Robertson, J. D.; Lanza, G. M.; Wickline, S. A. Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with alpha(v)beta(3)-Integrin-targeted nanoparticles. *Circulation* **2003**, 108 (18), 2270-2274.

<sup>62</sup> Johansson, L. O.; Bjornerud, A.; Ahlstrom, H. K.; Ladd, D. L.; Fujii, D. K. A targeted contrast agent for magnetic resonance imaging of thrombus: Implications of spatial resolution. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2001**, 13 (4), 615-618.

abordajes involucran la utilización de métodos PARACEST para la detección de metabolitos específicos como glucosa,<sup>19</sup> lactato,<sup>21</sup> de cambios de temperatura<sup>22</sup> o pH.<sup>20</sup>

También cabe destacar agentes de contrastes enfocados a dianas moleculares como por ejemplo el empleo de sistemas que se sirven de las interacciones presentes en la naturaleza, como la interacción avidina - biotina, como sistemas para aumentar la acumulación de complejo de Gd(III), iones monovalentes o divalentes.<sup>9</sup> Merece también mención especial, la utilización de métodos de imagen espectroscópica MRSI para detectar pH extracelular<sup>64</sup> o pO<sub>2</sub> en tumores.<sup>42</sup>

---

<sup>63</sup> Yu, X.; Song, S. K.; Chen, J. J.; Scott, M. J.; Fuhrhop, R. J.; Hall, C. S.; Gaffney, P. J.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M. High-resolution MRI characterization of human thrombus using a novel fibrin-targeted paramagnetic nanoparticle contrast agent. *Magnetic Resonance in Medicine* **2000**, *44* (6), 867-872.

<sup>19</sup> Ren, J.; Trokowski, R.; Zhang, S.; Malloy, C. R.; Sherry, A. Imaging the Tissue Distribution of Glucose in Livers Using A PARACEST Sensor. *Magnetic Resonance in Medicine* **2008**, *60* (5), 1047-1055.

<sup>21</sup> Aime, S.; Delli Castelli, D.; Fedeli, F.; Terreno, E. A paramagnetic MRI-CEST agent responsive to lactate concentration. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (32), 9364-9365.

<sup>22</sup> Delli Castelli, D.; Terreno, E.; Aime, S. Yb-III-HPDO3A: A Dual pH- and Temperature-Responsive CEST Agent. *Angewandte Chemie-International Edition* **2011**, *50* (8), 1798-1800.

<sup>20</sup> Aime, S.; Barge, A.; Delli Castelli, D.; Fedeli, F.; Mortillaro, A.; Nielsen, F. U.; Terreno, E. Paramagnetic lanthanide(III) complexes as pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agents for MRI applications. *Magnetic Resonance in Medicine* **2002**, *47* (4), 639-648.

<sup>9</sup> Tei, L.; Barge, A.; Crich, S. G.; Pagliarin, R.; Negri, V.; Ramella, D.; Cravotto, G.; Aime, S. Target Visualization by MRI Using the Avidin/Biotin Amplification Route: Synthesis and Testing of a Biotin-Gd-DOTA Monoamide Trimer. *Chemistry-A European Journal* **2010**, *16* (27), 8080-8087.

<sup>64</sup> Alvarez-Perez, J.; Ballesteros, P.; Cerdan, S. Microscopic images of intraspheroidal pH by H-1 magnetic resonance chemical shift imaging of pH sensitive indicators. *Magnetic Resonance Materials in Physics Biology and Medicine* **2005**, *18* (6), 293-301.

<sup>42</sup> Pacheco-Torres, J.; Lopez-Larrubia, P.; Ballesteros, P.; Cerdan, S. Imaging tumor hypoxia by Magnetic Resonance methods. *Nmr in Biomedicine* **2011**, *24* (1), 1-16.

## 2.3. DIFUSIÓN DEL AGUA EN IMAGEN POR RESONANCIA MAGNÉTICA

La imagen por resonancia magnética ponderada en difusión (DWI), incluye una serie de metodologías de MRI que permiten visualizar in vivo, la difusión al azar del agua en los tejidos, a través de los efectos que ésta produce sobre la intensidad de la imagen MRI. Las moléculas de agua se comportan en este contexto como verdaderas sondas moleculares dinámicas, cuyo movimiento al azar revela importantes detalles microscópicos de la arquitectura de tejidos sanos o enfermos.<sup>65</sup>

Se entiende por difusión el movimiento traslacional aleatorio de las moléculas de agua, también conocido como movimiento browniano, producido por la energía térmica almacenada en estas moléculas.<sup>66</sup> Aunque el primer estudio moderno de la difusión molecular fue llevado a cabo por Thomas Graham, que consiguió medir el coeficiente de difusión del CO<sub>2</sub> en 1867 y fue confirmado por estudios de Maxwell,<sup>67</sup> no fue hasta el próximo siglo que Einstein,<sup>68</sup> Smoluchowsky<sup>69</sup> y Perrin<sup>70</sup> desarrollaron los modelos que relacionan la difusión con la movilidad, geometría molecular y microviscosidad del medio circundante.

Brevemente, en un medio libre sin obstrucciones y en un intervalo de tiempo definido (tiempo de difusión  $t_{\text{dif}}$ ), el desplazamiento de la colectividad molecular sigue una distribución Gaussiana tridimensional, donde las moléculas viajan aleatoriamente cubriendo un espacio promedio ( $\langle x \rangle$ ) que se describe estadísticamente mediante el coeficiente de difusión ( $D$ ). Existe una relación importante entre el recorrido medio, el coeficiente de difusión y el tiempo de difusión;  $\langle x \rangle = (2D \cdot t_{\text{dif}})^{1/2}$  que expresa que para un mismo

---

<sup>65</sup> Le Bihan, D. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nature Reviews Neuroscience* **2003**, 4 (6), 469-480.

<sup>66</sup> Einstein, A. Investigations on the Theory of Brownian Motion. 1956. Furthe, R. & Cowper, A. D.

<sup>67</sup> Clerk-Maxwell, J. On Loschmidt's Experiments on Diffusion in Relation to the Kinetic Theory of Gases. *Nature* **1873**, 8, 298-300.

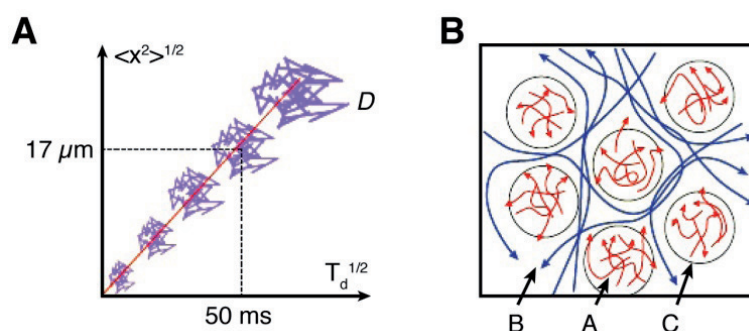
<sup>68</sup> Einstein, A. The motion of elements suspended in static liquids as claimed in the molecular kinetic theory of heat. *Annalen der Physik* **1905**, 17(8), 549-560.

<sup>69</sup> von Smoluchowski, M. The kinetic theory of Brownian molecular motion and suspensions. *Annalen der Physik* **1906**, 21 (14), 756-780.

<sup>70</sup> Perrin, F. The Brownien movement of an ellipsoide. - The dielectric dispersion of ellipsoidal molecules. *Journal de Physique et Le Radium* **1934**, 5, 497-511.



tiempo de difusión, una molécula con alto  $D$  viaja a mayor distancia promedio que una con bajo  $D$ . El coeficiente de difusión  $D$  depende del tamaño de la molécula, de la temperatura y de la viscosidad del medio. Por ejemplo en el caso de moléculas de agua libre, a 37 °C, el coeficiente de difusión es  $3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  que se traduce en una distancia media de difusión de 17  $\mu\text{m}$  en 50 ms. En estas condiciones, aproximadamente el 32% de las moléculas se han movido al menos a esta distancia, mientras que solo el 5% ha viajado a distancias superiores a 34 micras (Figura 2.7 A).



**Figura 2.7.** Difusión del agua en medio libre de obstrucciones (A) y en tejidos (B).<sup>64</sup>

Sin embargo, en un medio con obstrucciones como los que se encuentran en los tejidos, el coeficiente de difusión aparente (ADC) del agua disminuye en general, con el radio de giro de las obstrucciones ( $R_G$ ) encontradas en su desplazamiento medio, según la expresión de Stokes-Einstein.<sup>71</sup>

$$ADC = k/R_G (1 + 2.5 \Phi) \quad \text{Ecuación 2.8}$$

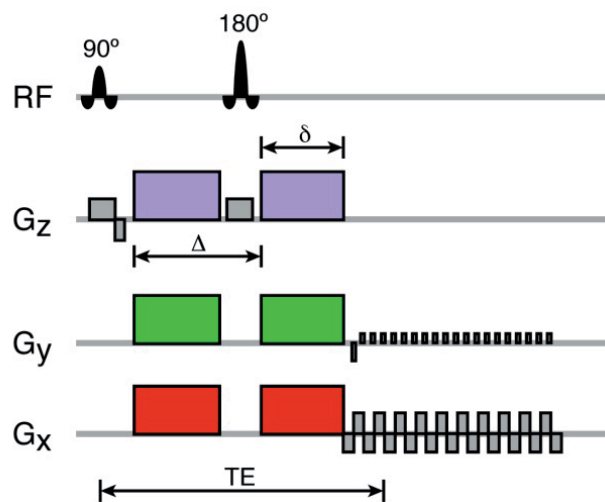
Donde  $k$  es una constante para una determinada temperatura y  $\Phi$  un factor de obstrucción, que revela el volumen fraccional de la solución ocupado por las obstrucciones.

<sup>64</sup> Le Bihan, D. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nature Reviews Neuroscience* **2003**, 4 (6), 469-480.

<sup>71</sup> García-Pérez, A. I.; Lopez-Beltran, E. A.; Kluner, P.; Luque, J.; Ballesteros, P.; Cerdan, S. Molecular crowding and viscosity as determinants of translational diffusion of metabolites in subcellular organelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1999**, 362 (2), 329-338.

Más concretamente, en las células y tejidos biológicos aparecen obstáculos que limitan el proceso de la libre difusión de las moléculas de agua (Figura 2.7 B). La difusión de las moléculas de agua puede ser restringida a espacios cerrados como en las células (A), puede verse obstaculizada por vías tortuosas (B) o ralentizada en los desplazamientos entre compartimentos (C). Así que en tejidos biológicos, se sustituye el coeficiente de difusión físico  $D$  por un parámetro estadístico y global: el coeficiente de difusión aparente, que habitualmente es menor que  $D$ , pero que refleja de manera más apropiada la microestructura del tejido.

Stejskal y Tanner en la década de los 1960<sup>72</sup> demostraron que el ADC de una molécula, podría medirse mediante una secuencia de spin-echo, por la disminución de intensidad de los ecos inducida mediante la aplicación de dos gradientes de difusión de intensidad creciente, localizados simétricamente a ambos lados del pulso  $180^\circ$  (Figura 2.8).



**Figura 2.8.** Secuencia spin-eco de imagen potenciada en difusión<sup>73</sup>

La atenuación relativa del eco B se describe por:

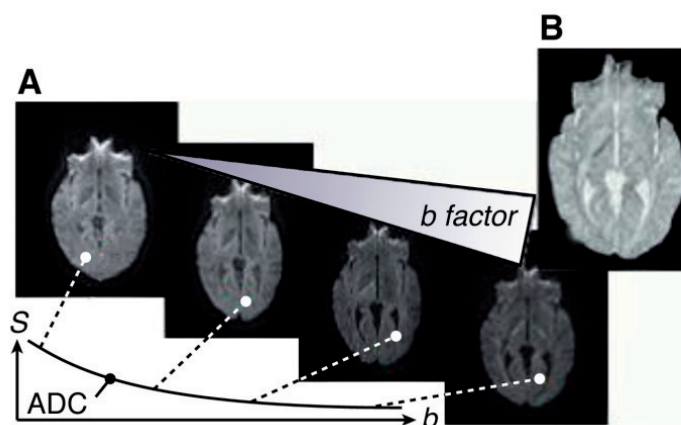
$$B = e^{(-b \cdot ADC)}$$

**Ecuación 2.9**

<sup>72</sup> Stejskal, E. O.; Tanner, J. E. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of A Time-Dependent Field Gradient. *Journal of Chemical Physics* **1965**, 42 (1), 288-292.

<sup>73</sup> Alexander, A. L.; Lee, J. E.; Lazar, M.; Field, A. S. Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics* **2007**, 4 (3), 316-329.

Donde  $b$  es un término que incluye la fuerza y la duración del gradiente de difusión (en  $\text{mm}^2\text{s}^{-2}$ ) y ADC es el coeficiente aparente de difusión traslacional ( $\text{mm}^2/\text{s}^{-1}$ ). Básicamente la secuencia ponderada en difusión contiene gradientes de difusión de duración de  $\delta$  ms, localizados simétricamente al pulso de  $180^\circ$ , y separados por un intervalo  $\Delta$  que determina la duración de la medida de la difusión ( $t_{\text{dif}}$ ).<sup>74</sup> Los ecos generados por el aumento de los valores de  $b$  son exponencialmente decrecientes y se adquieren mediante uno o más disparos Echo Planares (EPI). El ADC para cada píxel se puede medir ajustando los valores de intensidad relativa del eco B a los valores de  $b$ , utilizando la Ecuación 2.8, como se observa en la Figura 2.9. Dado que el gradiente de difusión, puede aplicarse en cualquier dirección del espacio, implica que es posible determinar ADC en cualquier orientación espacial, y por tanto evaluar la microestructura tisular en cualquier dirección. En muchos casos, la estructura tisular y las obstrucciones al movimiento aleatorio del agua no son isotrópicas, lo que permite evaluar mediante DWI la orientación espacial de las obstrucciones encontradas.



**Figura 2.9.** Determinación de ADC (B) a partir de imágenes potenciadas en difusión (A) obtenidas con valores crecientes de  $b$ .<sup>65</sup>

<sup>74</sup> Garcia-Martin, M. L.; Ballesteros, P.; Cerdan, S. The metabolism of water in cells and tissues as detected by NMR methods. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2001**, 39 (1), 41-77.

<sup>65</sup> Le Bihan, D. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nature Reviews Neuroscience* **2003**, 4 (6), 469-480.

### 2.3.1. Imagen del Tensor de Difusión: Difusión anisotrópica

En el aparato anterior se describe que es posible obtener para cada pixel de la imagen de eco de spin, una colección de vectores de difusión, orientados en tantas direcciones como se haya orientado el gradiente de difusión utilizado en la adquisición. El tensor de difusión es el vector resultante de considerar todos los vectores individuales y representa la dirección preferida de difusión en cada pixel. El vector Tensor contiene un módulo, el valor numérico que revela la difusividad media en el pixel, y una dirección. Esto hace posible la preparación de mapas de difusividad media y de anisotropía fraccional en cada pixel.<sup>75</sup> Es posible establecer conectividades del tensor de difusión entre pixeles vecinos, expresándolas como probabilidad. Un análisis probabilístico permite obtener el tractograma, que representa la distribución tridimensional más probable de las conectividades entre pixeles.

La Figura 2.10 ilustra los conceptos del tensor de difusión y tractografía, utilizando el cerebro humano como ejemplo.<sup>75</sup> Brevemente, en un medio anisotrópico como el cerebro, el tensor de ADC es más rápido a lo largo de las rutas que muestran menos obstrucciones o restricciones. En un sistema tubular como el de los tractos axonales de la sustancia blanca cerebral, ADC será más rápido en la dirección de los axones que en el plano perpendicular, limitado por las vainas de mielina de las paredes axonales (Figura 2.10 A). La determinación del ADC en los tres ejes ortogonales, permite obtener los valores de ADC en estas tres direcciones (Figura 2.10 B).<sup>72</sup> Esto se ilustra (Figura 2.10 C) en los mapas de ADC del cerebro normal obtenidos en tres direcciones ortogonales. Curiosamente, los mapas ADC obtenidos son diferentes en cada una de las tres orientaciones exploradas, revelando una difusión claramente anisotrópica en el cerebro. El enfoque se puede completar con direcciones adicionales de codificación de difusión: mapeando todo el elipsoide del tensor de difusión, como se ilustra en la

<sup>75</sup> Mori, S.; Zhang, J. Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. *Neuron* **2006**, 51 (5), 527-539.

<sup>72</sup> Stejskal, E. O.; Tanner, J. E. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of A Time-Dependent Field Gradient. *Journal of Chemical Physics* **1965**, 42 (1), 288-292.

Figura 2.10 D.<sup>65</sup> Los mapas de ADC obtenidos en las diferentes direcciones pueden asumir un código de color, obteniendo difusión anisotrópica, donde el color refleja la dirección (Figura 2.10 D-b). Por último, es posible conectar las regiones con la misma dirección de ADC, obteniendo el seguimiento de las direcciones preferidas de difusión y por lo tanto la dirección más probable de las fibras de mielina.

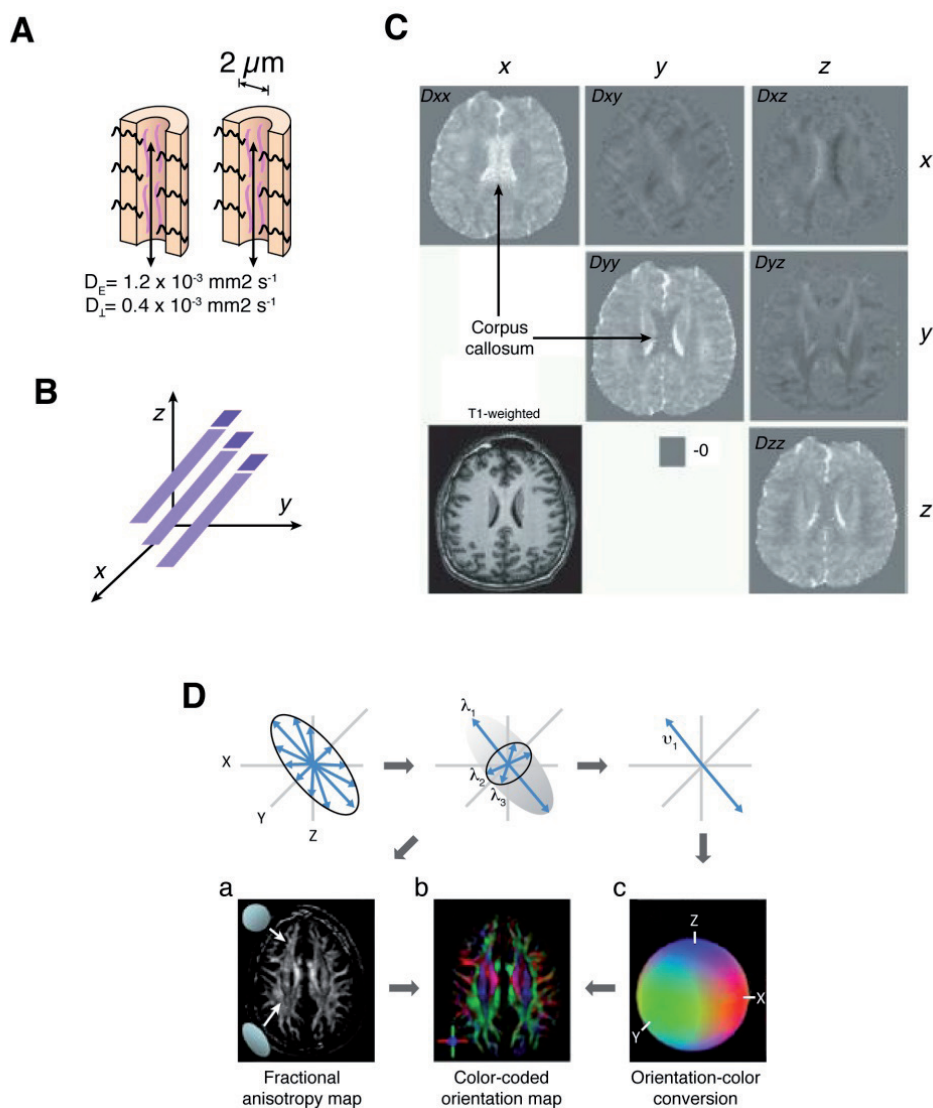


Figura 2.10. Principios de la difusión anisotrópica del agua en el cerebro humano.<sup>65</sup>

<sup>65</sup> Le Bihan, D. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nature Reviews Neuroscience* **2003**, 4 (6), 469-480.

En las secciones anteriores hemos demostrado que la imagen por difusión ha alcanzado un desarrollo espectacular en los últimos años. A pesar de ello, la resolución resulta mejorable en muchos casos y resultaría muy interesante disponer de agentes de contraste para resaltar específicamente alguno de sus elementos. Idealmente estos agentes de contraste podrían realzar las imágenes de difusión de igual manera que los agentes de relajatividad resaltan las imágenes pesadas en  $T_1$  o  $T_2$ . Sin embargo estas moléculas no existen hasta ahora. Esta tesis presentará en las siguientes secciones la primera generación de agentes de contraste para imagen ponderada en difusión.

## 2.4. NANOTUBOS DE CARBONO

Los nanotubos de carbono (CNTs), constituyen una nueva forma alotrópica del carbono. Fueron descubiertos por Sumio Iijima en 1991<sup>76</sup> mediante microscopía electrónica de alta resolución y dos años más tarde el mismo Iijima,<sup>77</sup> y de forma independiente Bethune y colaboradores,<sup>78</sup> descubrieron los nanotubos de pared sencilla. Se piensa que la morfología de los nanotubos de carbono deriva del plegamiento de una lámina de grafeno formando un cilindro que puede estar cerrado en las puntas. La Figura 2.11 muestra las formas alotrópicas del carbono.

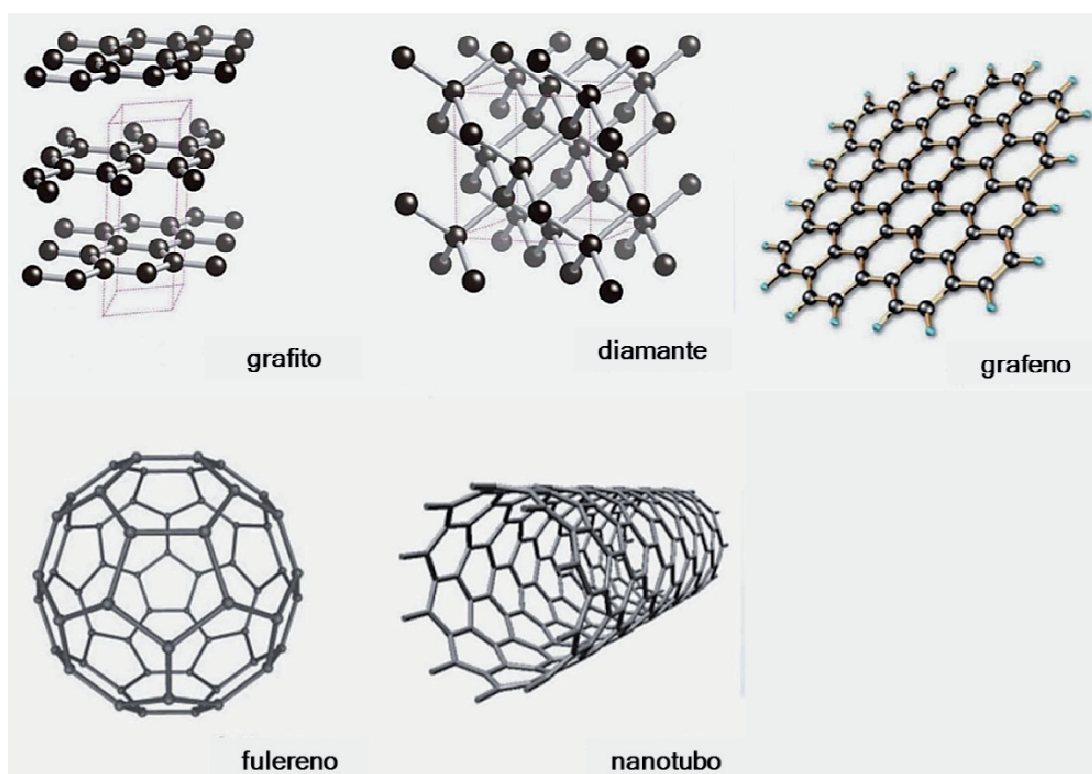


Figura 2.11. Formas alotrópicas de carbono<sup>79</sup>

<sup>76</sup> Iijima, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature* **1991**, 354, 56-58.

<sup>77</sup> Iijima, S.; Ichihashi, T. Single-Shell Carbon Nanotubes of 1-Nm Diameter. *Nature* **1993**, 363 (6430), 603-605.

<sup>78</sup> Bethune, D. S.; Kiang, C. H.; Devries, M. S.; Gorman, G.; Savoy, R.; Vazquez, J.; Beyers, R. Cobalt-Catalyzed Growth of Carbon Nanotubes with Single-Atomic-Layerwalls. *Nature* **1993**, 363 (6430), 605-607.

<sup>79</sup> Oganov, A. R.; Hemley, R. J.; Hazen, R. M.; Jones, A. P. *Structure, Bonding, and Mineralogy of Carbon at Extreme Conditions*; 2013.pp. 47-77.



Los nanotubos de carbono se pueden clasificar en dos tipos diferentes (Figura 2.12) según el número de capas: los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs), que son los formados por capas concéntricas, separadas aproximadamente a una distancia similar a la distancia interplanar del grafito y los nanotubos de carbono de pared sencilla, que se pueden describir como una lámina de grafeno enrollada en forma de cilindro de diámetro nanométrico (SWCNTs).

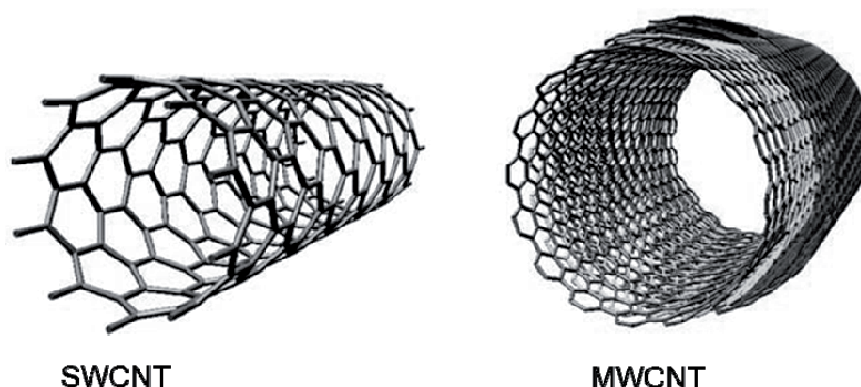


Figura 2.12. Nanotubos de carbono: SWCNTs y MWCNTs.

Dependiendo de si el plegamiento se forma de manera tal que los anillos hexagonales tengan un plano de simetría ortogonal o no al eje del cilindro, se obtienen tres tipos de nanotubos de carbono: *zigzag*, *quiral* y *armchair*, (Figura 2.13).

Los parámetros que caracterizan los tres tipos de nanotubos son el diámetro ( $d_t$ ) y el ángulo de quiralidad ( $\theta$ ), que confieren propiedades diferentes. Los tipos *zigzag* y *armchair* son conductores, mientras que los de tipo *quiral* son semiconductores. En los CNTs todos los carbonos presentan hibridación  $sp^2$ .



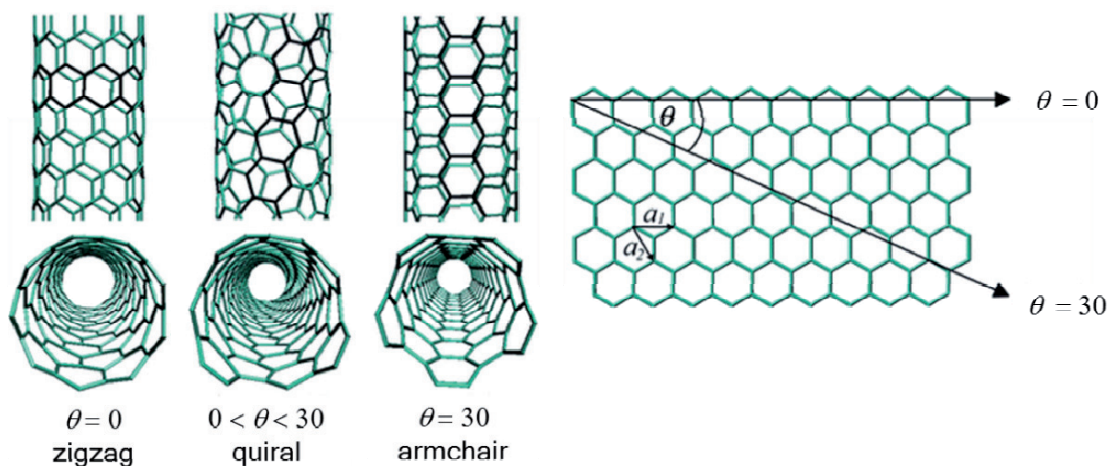


Figura 2.13. Tipos de nanotubos según el plegamiento.<sup>80</sup>

## 2.4.1. Métodos de producción de nanotubos de carbono

### 2.4.1.1. Método del Catalizador Flotante<sup>81</sup>

Con este método se producen, en un único proceso y de forma continua, los nanofilamentos catalíticos introduciendo en el reactor los reactivos. Se pueden obtener nanotubos tanto de mono como de pared múltiple. La síntesis tiene lugar en un reactor horizontal de cuarzo que se introduce en un horno alcanzando temperaturas muy elevadas, alrededor de 1200 °C. El precursor del catalizador suele ser Fe, organometálicos de Fe como  $\text{Fe}(\text{CO})_5$  o ferroceno  $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ . La fuente de carbono empleada suele ser benceno. Para incrementar la pureza de los nanotubos obtenidos y el rendimiento se suele emplear tiofeno como promotor de crecimiento.

<sup>80</sup> Galano, A. Carbon nanotubes: promising agents against free radicals. *Nanoscale* **2010**, 2(3), 373-380.

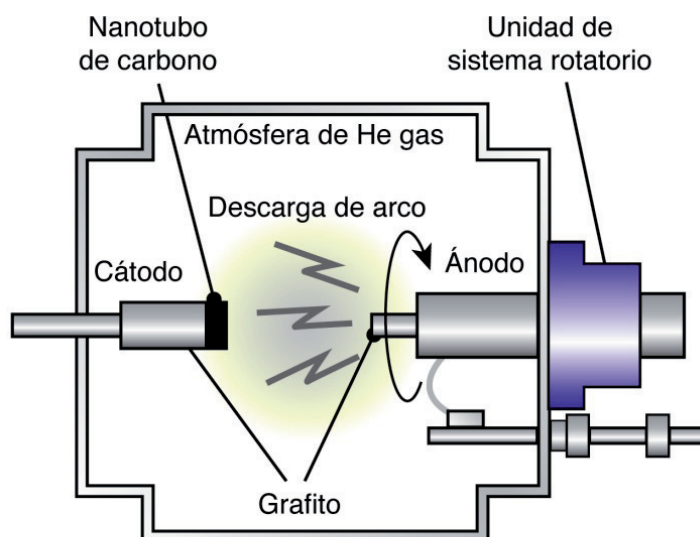
<sup>81</sup> Fan, Y. Y.; Kaufmann, A.; Mukasyan, A.; Varma, A. Single- and multi-wall carbon nanotubes produced using the floating catalyst method: Synthesis, purification and hydrogen up-take. *Carbon* **2006**, 44(11), 2160-2170.

### 2.4.1.2. Ablación Láser<sup>82,83</sup>

En el método de la "ablación láser" la fuente de carbono, que suele estar constituida por discos de grafito, es vaporizada por una corriente de He o Ar. El grafito puede ser puro o mezclado con un metal que actúa como catalizador en la producción de los nanotubos, que con este método son de pared sencilla.

### 2.4.1.3. Descarga de arco<sup>83</sup>

Este fue el primer método utilizado en la producción de nanotubos de carbono y es una técnica de producción de las más empleadas en la síntesis de MWCNTs en la actualidad.



Dispositivo de descarga de arco

**Figura 2.14.** Esquema del proceso de descarga de arco en la producción de los CNTs.<sup>84</sup>

En este método se establece una descarga de arco entre dos electrodos de carbono en una atmósfera inerte (Figura 2.14). Puede llevarse a cabo

<sup>82</sup> Thess, A.; Lee, R.; Nikolaev, P.; Dai, H. J.; Petit, P.; Robert, J.; Xu, C. H.; Lee, Y. H.; Kim, S. G.; Rinzler, A. G.; Colbert, D. T.; Scuseria, G. E.; Tomanek, D.; Fischer, J. E.; Smalley, R. E. Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes. *Science* **1996**, *273* (5274), 483-487.

<sup>83</sup> Latorre, N.; Ubieta, T.; Royo, C.; Romeo, E.; Villacampa, J. I.; Blas, E. S.; Monzon, A. Nanocarbon materials: Carbon nanotubes and nanofibers. Basic aspects and production. Madrid, 2004; pp 200-208.

<sup>84</sup> <http://www.rigaku.com/vacuum/app11-nanotube.html>, 2014.

utilizando grafito puro como fuente de carbono<sup>85</sup> o bien grafito mezclado con un metal (Co, Ni, Fe) que es co-evaporado junto con el carbono y que actúa como catalizador en la formación de los nanotubos.<sup>76,77</sup>

#### 2.4.1.4. Deposición química de vapor (CVD)<sup>86</sup>

Este método se lleva a cabo en dos pasos:

En primer lugar se deposita el catalizador sobre el sustrato y a continuación tiene lugar la nucleación por vía química o térmica. Se emplea amoníaco como entorno de reacción. Los catalizadores metálicos utilizados son Ni, Fe o Co.

El segundo paso está constituido por la introducción de la fuente de carbono en fase gas (metano, monóxido de carbono o acetileno) en la cámara de reacción. A continuación se distribuye el carbono sobre el sustrato que está recubierto de una capa de catalizador y los nanotubos empiezan a crecer encima del catalizador metálico. El gas empleado en la producción suele ser, amoníaco, hidrógeno o nitrógeno. Las temperaturas alcanzadas en la síntesis de los nanotubos oscilan entre 650 y 900 °C y el rendimiento es de un 30 %.

Los MWCNTs empleados en este trabajo han sido producidos por esta técnica.

#### 2.4.2. Propiedades y características.

Los nanotubos de carbono han revelado ser materiales con propiedades sorprendentes, empezando por su elevado módulo de Young (1-2 TPa)<sup>87-90</sup>

<sup>85</sup> Ebbesen, T. W.; Ajayan, P. M. Large-Scale Synthesis of Carbon Nanotubes. *Nature* **1992**, *358* (6383), 220-222.

<sup>76</sup> Iijima, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature* **1991**, *354* (6348), 56-58.

<sup>77</sup> Iijima, S.; Ichihashi, T. Single-Shell Carbon Nanotubes of 1-nm Diameter. *Nature* **1993**, *363* (6430), 603-605.

<sup>86</sup> Rajashree Hirlekar, M. Y. H. G. M. V. V. K. Carbon nanotubes and its applications: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **2009**, *2* (4), 17-27.

<sup>87</sup> Lu, J. P. Elastic properties of carbon nanotubes and nanoropes. *Physical Review Letters* **1997**, *79* (7), 1297-1300.

<sup>88</sup> Treacy, M. M. J.; Ebbesen, T. W.; Gibson, J. M. Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes. *Nature* **1996**, *381* (6584), 678-680.

<sup>89</sup> Wong, E. W.; Sheehan, P. E.; Lieber, C. M. Nanobeam mechanics: Elasticity, strength, and toughness of nanorods and nanotubes. *Science* **1997**, *277* (5334), 1971-1975.

<sup>90</sup> Krishnan, A.; Dujardin, E.; Ebbesen, T. W.; Yianilos, P. N.; Treacy, M. M. J. Young's modulus of single-walled nanotubes. *Physical Review B* **1998**, *58* (20), 14013-14019.

que hace que estos materiales se encuentren entre los materiales más elásticos conocidos con una constante de elasticidad seis veces superior a la del acero de altas prestaciones y su resistencia a la tracción que puede alcanzar más de diez veces la de las fibras más resistentes como la poliparafenileno tereftalamida (Kevlar®).

La conductividad eléctrica de los nanotubos de carbono es destacable, estimada en  $10^9$  A/cm<sup>2</sup>.<sup>91</sup> En el caso de los nanotubos de carbono conductores, se ha descrito<sup>92</sup> que un electrón en el interior del nanotubo experimenta una conducción “balística” sin impedimento alguno y con un movimiento uniformemente acelerado en función del campo eléctrico.

La morfología de los nanotubos de carbono de pared sencilla SWCNT se caracteriza por un cilindro de diámetro constante de 1 a 3 nm y una longitud variable que puede alcanzar hasta varios milímetros. La alta relación longitud/diámetro, a veces superior a  $10^6$ , unida a la elevada conductividad eléctrica<sup>93,94</sup> hace que estos materiales puedan considerarse como “cables moleculares” cuando el nanotubo es de tipo conductor. Los nanotubos de tipo semiconductor son muy interesantes para desarrollar transistores de efecto campo de escala nanométrica.<sup>95,96</sup>

Los SWCNTs presentan gran área superficial con enlaces  $\pi$  continuos, por esta razón tienen tendencia a sufrir aglomeración formando “ovillos” (bundles) (Figura 2.15) de nanotubos que interaccionan a través de fuerzas de Van der Waals.<sup>97</sup> Esta aglomeración en ovillos de los SWCNTs no funcionalizados dificulta su análisis por Microscopio Electrónico de

<sup>91</sup> Wei, B. Q.; Vajtai, R.; Ajayan, P. M. Reliability and current carrying capacity of carbon nanotubes. *Applied Physics Letters* **2001**, *79*(8), 1172-1174.

<sup>92</sup> Tans, S. J.; Verschueren, A. R. M.; Dekker, C. Room-temperature transistor based on a single carbon nanotube. *Nature* **1998**, *393*(6680), 49-52.

<sup>93</sup> White, C. T.; Todorov, T. N. Carbon nanotubes as long ballistic conductors. *Nature* **1998**, *393*(6682), 240-242.

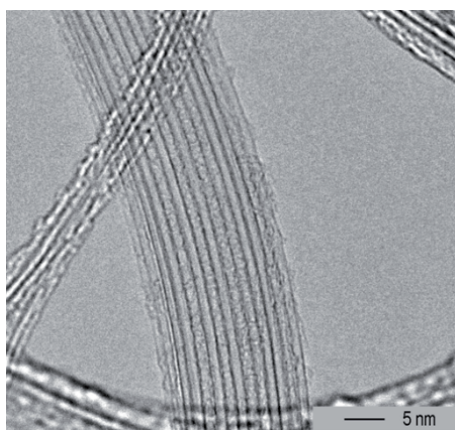
<sup>94</sup> Ebbesen, T. W.; Lezec, H. J.; Hiura, H.; Bennett, J. W.; Ghaemi, H. F.; Thio, T. Electrical conductivity of individual carbon nanotubes. *Nature* **1996**, *382*(6586), 54-56.

<sup>95</sup> Javey, A.; Guo, J.; Wang, Q.; Lundstrom, M.; Dai, H. J. Ballistic carbon nanotube field-effect transistors. *Nature* **2003**, *424*(6949), 654-657.

<sup>96</sup> Zhao, J. J.; Xie, R. H. Electronic and photonic properties of doped carbon nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2003**, *3*(6), 459-478.

<sup>97</sup> Henrard, L.; Hernandez, E.; Bernier, P.; Rubio, A. van der Waals interaction in nanotube bundles: Consequences on vibrational modes. *Physical Review B* **1999**, *60*(12), 8521-8524.

Transmisión (TEM) a la hora de realizar estudios cuantitativos del tamaño de los nanotubos y por esta razón en esta tesis se ha cambiado a los MWCNTs. El problema de la elevada tendencia de los SWCNTs a sufrir aglomeración ha sido tratado mediante diversas metodologías como la adición de surfactantes, técnicas de sonicación y funcionalización covalente, a través de formación de complejos de transferencia de carga, o mediante la formación de aductos por interacciones  $\pi$ - $\pi$ .



**Figura 2.15.** Imagen TEM de un ovillo de SWCNTs.

### 2.4.3. Purificación

Los nanotubos “crudos” requieren una purificación para la eliminación del grafito y de los restos de catalizadores metálicos empleados en la producción de los mismos. El procedimiento de purificación más ampliamente utilizado consiste en el tratamiento del crudo del nanotubo a temperaturas moderadas o altas con ácidos, por ejemplo disolución acuosa de ácido nítrico<sup>98</sup> o también con mezclas de  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ .<sup>99</sup> En estas condiciones se produce la disolución del residuo metálico que impurifica el material junto con la oxidación parcial del nanotubo y de otros residuos carbonáceos. Dependiendo del tamaño y de las condiciones de

<sup>98</sup> Bourlinos, A. B.; Georgakilas, V.; Tzitzios, V.; Boukos, N.; Herrera, R.; Giannelis, E. R. Functionalized carbon nanotubes: Synthesis of meltable and amphiphilic derivatives. *Small* **2006**, 2(10), 1188-1191.

<sup>99</sup> Samori, C.; Sainz, R.; Menard-Moyon, C.; Toma, F. M.; Venturelli, E.; Singh, P.; Ballestri, M.; Prato, M.; Bianco, A. Potentiometric titration as a straightforward method to assess the number of functional groups on shortened carbon nanotubes. *Carbon* **2010**, 48(9), 2447-2454.

temperatura, del tiempo de tratamiento y de la concentración de ácido empleada, se puede producir la disolución completa del carbono amorfo y el acortamiento de la longitud de los nanotubos por degradación oxidativa de enlaces C-C dando lugar a nanotubos más cortos, de mayor pureza y con una alta funcionalización con grupos carboxílicos, situados sobre todo en las puntas de los nanotubos.

#### 2.4.4. Funcionalización

En los últimos años se han llevado a cabo diferentes metodologías de funcionalización de los nanotubos de carbono necesarias para el empleo de los mismos en diferentes campos. Por ejemplo, se ha propuesto mejorar las propiedades de los CNTs en cuanto a conductividad eléctrica y resistencia mecánica, con nuevas funcionalidades que residan en las subunidades introducidas en los nanotubos. Además, la funcionalización de los nanotubos puede servir para introducir respuestas frente a estímulos externos como la radiación UV/Visible, potenciales eléctricos o reactivos químicos.

Existen dos estrategias para la funcionalización de los nanotubos: una funcionalización que implica la formación de enlaces covalentes o una de tipo no covalente que consiste en la formación de complejos de transferencia de carga de una gran estabilidad, a través de fuerzas de Van der Waals e interacciones de tipo  $\pi-\pi$ . Se han desarrollado diversas aproximaciones sintéticas para la funcionalización de estos sistemas<sup>98,100-</sup>

---

<sup>98</sup> Bourlinos, A. B.; Georgakilas, V.; Tzitzios, V.; Boukos, N.; Herrera, R.; Giannelis, E. R. Functionalized carbon nanotubes: Synthesis of meltable and amphiphilic derivatives. *Small* **2006**, *2* (10), 1188-1191.

<sup>100</sup> Georgakilas, V.; Kordatos, K.; Prato, M.; Guldi, D. M.; Holzinger, M.; Hirsch, A. Organic functionalization of carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (5), 760-761.

<sup>101</sup> Georgakilas, V.; Tagmatarchis, N.; Pantarotto, D.; Bianco, A.; Briand, J. P.; Prato, M. Amino acid functionalisation of water soluble carbon nanotubes. *Chem. Commun.* **2002**, (24), 3050-3051.

<sup>102</sup> Liu, J.; Rinzler, A. G.; Dai, H. J.; Hafner, J. H.; Bradley, R. K.; Boul, P. J.; Lu, A.; Iverson, T.; Shelimov, K.; Huffman, C. B.; Rodriguez-Macias, F.; Shon, Y. S.; Lee, T. R.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E. Fullerene pipes. *Science* **1998**, *280* (5367), 1253-1256.

<sup>102</sup> que permiten modular su solubilidad tanto en agua como en disolventes orgánicos, reduciendo su toxicidad.

#### 2.4.4.1. Funcionalización covalente

La modificación química de nanotubos de carbono es un área emergente en ciencia de los materiales. Muchas aplicaciones de los nanotubos de carbono se basan en la funcionalización de su superficie. En la Figura 2.16, se muestran las principales funcionalizaciones covalentes en la superficie de los nanotubos.<sup>103</sup> En esta memoria se comentaran solo algunos ejemplos de funcionalización covalente y se llevará acabo la oxidación de los nanotubos como uno de los métodos de fragmentación empleados.

Durante la primera etapa de la manipulación de los CNTs, el tratamiento ácido con ácido nítrico o con una mezcla sulfonítrica resultó efectivo para acortar los nanotubos.<sup>104</sup>

Las puntas de los extremos de los nanotubos tienden a estar compuestas por semiesferas de fullereno más reactivas que las paredes laterales<sup>105</sup> y en las mismas paredes existen algunos defectos compuestos por parejas de pentágonos-heptagonos llamados defectos Stone-Walls, que presentan carbonos hibridados  $sp^3$ .

Estos defectos, así como los carbonos de las extremidades sufrirían los efectos de este tratamiento ácido oxidándose a ácidos carboxílicos.

---

<sup>103</sup> Wu, H. C.; Chang, X.; Liu, L.; Zhao, F.; Zhao, Y. Chemistry of carbon nanotubes in biomedical applications. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (6), 1036-1052.

<sup>104</sup> Liu, J.; Rinzler, A. G.; Dai, H. J.; Hafner, J. H.; Bradley, R. K.; Boul, P. J.; Lu, A.; Iverson, T.; Shelimov, K.; Huffman, C. B.; Rodriguez-Macias, F.; Shon, Y. S.; Lee, T. R.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E. Fullerene pipes. *Science* **1998**, *280* (5367), 1253-1256

<sup>105</sup> Hirsch, A. Functionalization of single-walled carbon nanotubes. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, *41* (11), 1853-1859.



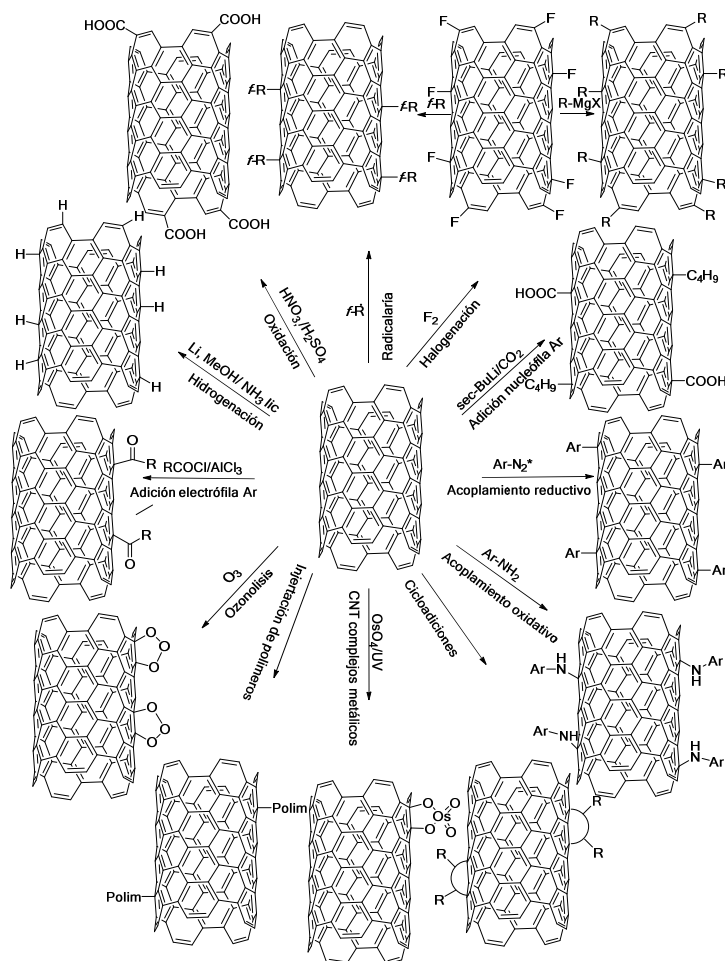


Figura 2.16. Funcionalización de nanotubos de carbono en la superficie.<sup>103</sup>

Hay muchos estudios que muestran la funcionalización a través de estas unidades carboxílicas como describen Su y colaboradores la formación de ésteres<sup>106,107</sup> o Chen et al. a través de la formación de enlace tipo amídico<sup>108</sup> y de sales de carboxilatos de amonio<sup>109</sup> (Esquema sintético 2.1).

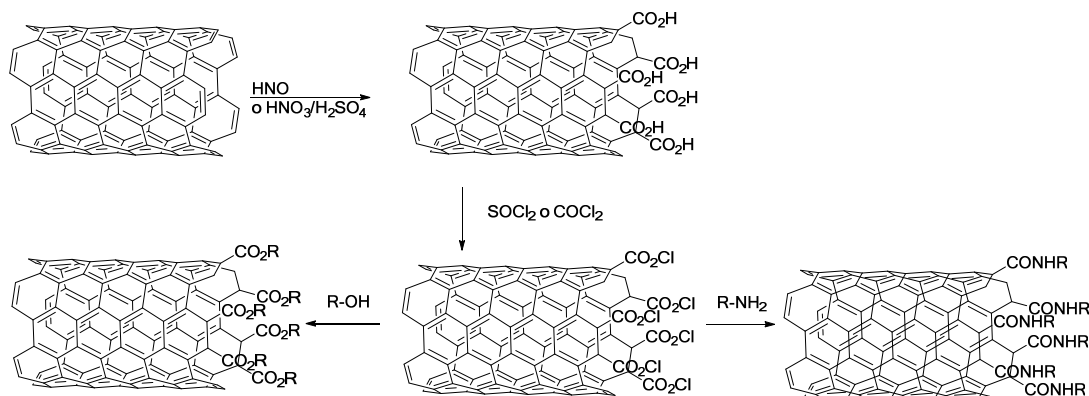
<sup>106</sup> Riggs, J. E.; Guo, Z. X.; Carroll, D. L.; Sun, Y. P. Strong luminescence of solubilized carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (24), 5879-5880.

<sup>107</sup> Sun, Y. P.; Huang, W. J.; Lin, Y.; Fu, K. F.; Kitaygorodskiy, A.; Riddle, L. A.; Yu, Y. J.; Carroll, D. L. Soluble dendron-functionalized carbon nanotubes: Preparation, characterization, and properties. *Chemistry of Materials* **2001**, *13* (9), 2864-2869.

<sup>108</sup> Chen, J.; Hamon, M. A.; Hu, H.; Chen, Y. S.; Rao, A. M.; Eklund, P. C.; Haddon, R. C. Solution properties of single-walled carbon nanotubes. *Science* **1998**, *282* (5386), 95-98.

<sup>109</sup> Chen, J.; Rao, A. M.; Lyuksyutov, S.; Itkis, M. E.; Hamon, M. A.; Hu, H.; Cohn, R. W.; Eklund, P. C.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E.; Haddon, R. C. Dissolution of full-length single-walled carbon nanotubes. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (13), 2525-2528.





**Esquema sintético 2.1.** Funcionalización de nanotubos de carbono vía carboxilatos.

Otro ejemplo de funcionalización es la halogenación: el flúor puede derivatizar las paredes del nanotubo a temperaturas comprendidas entre 25 y 600 °C,<sup>110</sup> los carbonos ligados a flúor tendrán hibridación  $sp^3$  y configuración tetraédrica, rompiendo la banda electrónica de los nanotubos convirtiéndolos de conductores o semiconductores en material aislante.<sup>111</sup> Otra ventaja de la fluorinación es que el flúor puede ser sustituido por un grupo alquílico por reacción con reactivos de Grignard<sup>112</sup> u organolíticos.<sup>113</sup> Unger y colaboradores<sup>114</sup> han descrito la cloración y bromación de nanotubos.

Las reacciones de cicloadición constituyen otra importante vía de funcionalización de las paredes de los nanotubos. Delgado y colaboradores

<sup>110</sup> Hamwi, A.; Alvergnat, H.; Bonnamy, S.; Beguin, F. Fluorination of carbon nanotubes. *Carbon* **1997**, 35(6), 723-728.

<sup>111</sup> Wilson, S. R.; Cayetano, V.; Yurchenko, M. Advanced materials: fluorinated fullerenes and nanotubes. *Tetrahedron* **2002**, 58(20), 4041-4047.

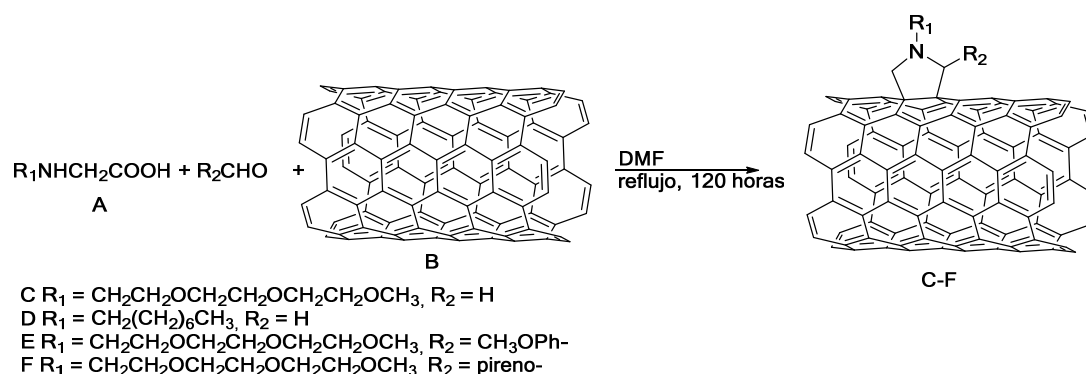
<sup>112</sup> Boul, P. J.; Liu, J.; Mickelson, E. T.; Huffman, C. B.; Ericson, L. M.; Chiang, I. W.; Smith, K. A.; Colbert, D. T.; Hauge, R. H.; Margrave, J. L.; Smalley, R. E. Reversible sidewall functionalization of buckytubes. *Chemical Physics Letters* **1999**, 310(3-4), 367-372.

<sup>113</sup> Saini, R. K.; Chiang, I. W.; Peng, H. Q.; Smalley, R. E.; Billups, W. E.; Hauge, R. H.; Margrave, J. L. Covalent sidewall functionalization of single wall carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125(12), 3617-3621.

<sup>114</sup> Unger, E.; Graham, A.; Kreupl, F.; Liebau, M.; Hoenlein, W. Electrochemical functionalization of multi-walled carbon nanotubes for solvation and purification. *Current Applied Physics* **2002**, 2(2), 107-111.

describen la reacción de Diels-Alder asistida por microondas en la superficie de los nanotubos.<sup>115</sup>

Entre las reacciones de cicloadición cabe destacar el proceso desarrollado por Prato<sup>101</sup> que consiste en una cicloadición 1,3 dipolar entre la superficie del nanotubo y un iluro de azometino generado *in situ* por condensación de un  $\alpha$ -amino ácido y un aldehído que da lugar a un anillo pirrolidínico fusionado, según el Esquema sintético 2.2.



**Esquema sintético 2.2.** Funcionalización a través de la reacción de Prato.<sup>100</sup>

Con esta metodología se pueden introducir diferentes grupos funcionales en las paredes de los nanotubos eligiendo apropiadamente los aminoácidos y el aldehído.

#### 2.4.4.2. Funcionalización no covalente<sup>116</sup>

Otro tipo de funcionalización es la que emplea la formación de complejos de transferencia de carga o la formación de aductos por interacciones  $\pi$ - $\pi$ , está dominada por las fuerzas de Van der Waals o interacciones  $\pi$ - $\pi$  y está controlada por la termodinámica. En la presente memoria se utiliza esta

<sup>115</sup> Delgado, J. L.; de la Cruz, P.; Langa, F.; Urbina, A.; Casado, J.; Navarrete, J. T. L. Microwave-assisted sidewall functionalization of single-wall carbon nanotubes by Diels-Alder cycloaddition. *Chem. Commun.* **2004**, (15), 1734-1735.

<sup>101</sup> Georgakilas, V.; Tagmatarchis, N.; Pantarotto, D.; Bianco, A.; Briand, J. P.; Prato, M. Amino acid functionalisation of water soluble carbon nanotubes. *Chem. Commun.* **2002**, (24), 3050-3051.

<sup>100</sup> Georgakilas, V.; Kordatos, K.; Prato, M.; Guldi, D. M.; Holzinger, M.; Hirsch, A. Organic functionalization of carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (5), 760-761.

<sup>116</sup> Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. Chemistry of carbon nanotubes. *Chemical Reviews* **2006**, *106* (3), 1105-1136.

metodología para funcionalizar los nanotubos a través de la formación de aductos por interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre la superficie del nanotubo y derivados de pireno. Muchas son las ventajas de esta derivatización: la red electrónica de los nanotubos permanece intacta, su solubilidad es favorecida y se posibilita el estudio con técnicas de la fluorescencia al introducir un conocido fluoróforo como es el pireno.

En el caso de emplear moléculas tales como derivados de pireno, porfirinas y macrociclos aromáticos, se ha establecido que la interacción se produce por asociación de éstas moléculas con las paredes de los nanotubos a través de interacciones  $\pi$ - $\pi$  o Dador-Aceptor.<sup>117</sup> En el caso de utilizar polímeros, éstos pueden alinearse alrededor del eje del nanotubo recubriéndolo en forma de hélice, formando un agregado supramolecular.<sup>118</sup>

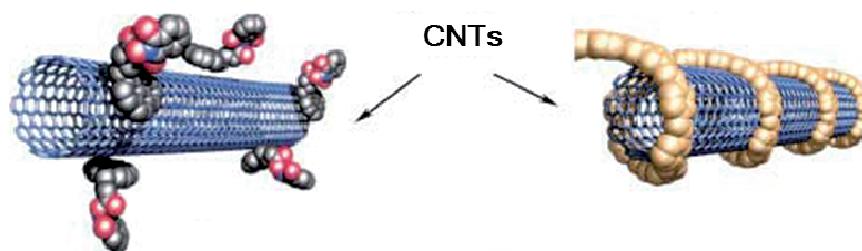


Figura 2.17. Ejemplos de funcionalización no covalente de CNTs.<sup>105</sup>

En la literatura se encuentran muchos ejemplos de derivatización no covalente: con varias especies de polímeros,<sup>119,120</sup> compuestos aromáticos polinucleares,<sup>121-125</sup> surfactantes,<sup>126-128</sup> y biomoléculas.<sup>129</sup> Las interacciones

<sup>117</sup> Chen, R. J.; Zhang, Y. G.; Wang, D. W.; Dai, H. J. Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (16), 3838-3839.

<sup>118</sup> Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. Chemistry of carbon nanotubes. *Chemical Reviews* **2006**, *106* (3), 1105-1136.

<sup>105</sup> Hirsch, A. Functionalization of single-walled carbon nanotubes. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, *41* (11), 1853-1859.

<sup>119</sup> Thostenson, E. T.; Ren, Z. F.; Chou, T. W. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites Science and Technology* **2001**, *61* (13), 1899-1912.

<sup>120</sup> Andrews, R.; Jacques, D.; Qian, D. L.; Rantell, T. Multiwall carbon nanotubes: Synthesis and application. *Accounts of Chemical Research* **2002**, *35* (12), 1008-1017.

<sup>121</sup> Nakashima, N.; Tomonari, Y.; Murakami, H. Water-soluble single-walled carbon nanotubes via noncovalent sidewall-functionalization with a pyrene-carrying ammonium ion. *Chemistry Letters* **2002**, (6), 638-639.

$\pi$ - $\pi$  se emplean para funcionalizar de forma controlada la superficie de los nanotubos, Zhu<sup>130</sup> y colaboradores describen diferentes funcionalizaciones de nanotubos con óxidos de pireno, Chen y colaboradores describen la funcionalización de nanotubos de carbono con ácido pirenilbutírico en su forma activada de *N*-hidroxisuccinilimida (15) para la inmovilización de proteínas.<sup>117</sup>

---

<sup>122</sup> Zhang, J.; Lee, J. K.; Wu, Y.; Murray, R. W. Photoluminescence and electronic interaction of anthracene derivatives adsorbed on sidewalls of single-walled carbon nanotubes. *Nano Letters* **2003**, *3* (3), 403-407.

<sup>123</sup> Fernando, K. A. S.; Lin, Y.; Wang, W.; Kumar, S.; Zhou, B.; Xie, S. Y.; Cureton, L. T.; Sun, Y. P. Diminished band-gap transitions of single-walled carbon nanotubes in complexation with aromatic molecules. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (33), 10234-10235.

<sup>124</sup> Fifield, L. S.; Dalton, L. R.; Addleman, R. S.; Galhotra, R. A.; Engelhard, M. H.; Fryxell, G. E.; Aardahl, C. L. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes with molecular anchors using supercritical fluids. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (25), 8737-8741.

<sup>125</sup> Paloniemi, H.; Aaritalo, T.; Laiho, T.; Liuke, H.; Kocharova, N.; Haapakka, K.; Terzi, F.; Seeber, R.; Lukkari, J. Water-soluble full-length single-wall carbon nanotube polyelectrolytes: Preparation and characterization. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (18), 8634-8642.

<sup>126</sup> Islam, M. F.; Rojas, E.; Bergey, D. M.; Johnson, A. T.; Yodh, A. G. High weight fraction surfactant solubilization of single-wall carbon nanotubes in water. *Nano Letters* **2003**, *3* (2), 269-273.

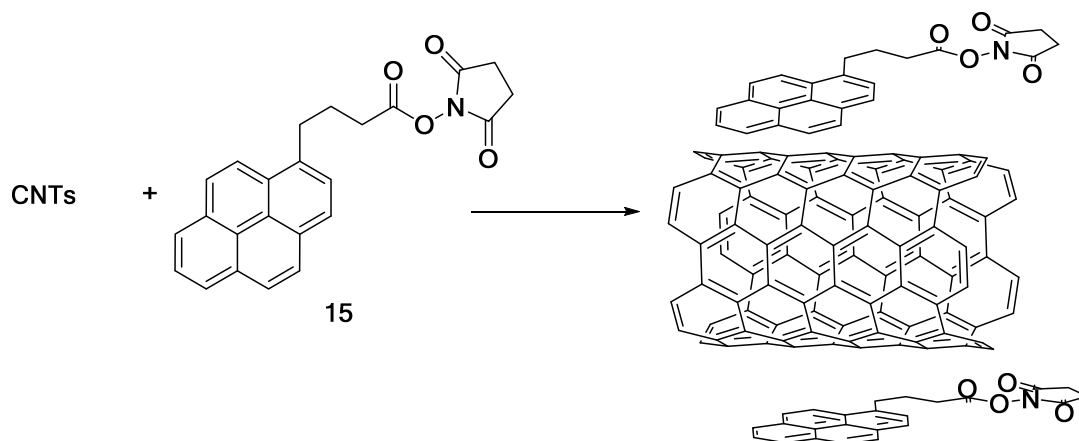
<sup>127</sup> Moore, V. C.; Strano, M. S.; Haroz, E. H.; Hauge, R. H.; Smalley, R. E.; Schmidt, J.; Talmon, Y. Individually suspended single-walled carbon nanotubes in various surfactants. *Nano Letters* **2003**, *3* (10), 1379-1382.

<sup>128</sup> Matarredona, O.; Rhoads, H.; Li, Z. R.; Harwell, J. H.; Balzano, L.; Resasco, D. E. Dispersion of single-walled carbon nanotubes in aqueous solutions of the anionic surfactant NaDDBS. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (48), 13357-13367.

<sup>129</sup> Katz, E.; Willner, I. Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: Applications in nanobioelectronics. *Chemphyschem* **2004**, *5* (8), 1085-1104.

<sup>130</sup> Zhu, J.; Yudasaka, M.; Zhang, M. F.; Kasuya, D.; Iijima, S. Surface modification approach to the patterned assembly of single-walled carbon nanomaterials. *Nano Letters* **2003**, *3* (9), 1239-1243.

<sup>117</sup> Chen, R. J.; Zhang, Y. G.; Wang, D. W.; Dai, H. J. Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (16), 3838-3839.



**Esquema sintético 2.3.** Ejemplo de funcionalización con derivados de pireno.<sup>116</sup>

Existen muchos otros ejemplos de funcionalización de nanotubos de carbono por métodos no covalentes. Esta introducción no pretende abarcar exhaustivamente el tema, sino ofrecer unas nociones que resulten útiles al enfoque de la tesis.

### 2.4.5. Aplicaciones

Existen muchas aplicaciones para los nanotubos en distintos campos de la investigación gracias a sus propiedades electrónicas, mecánicas, ópticas y químicas. Desde su descubrimiento se han publicado numerosos trabajos en los que los CNTs se describen como sustratos muy prometedores en el campo de la biomedicina.<sup>131</sup> En esta memoria se recogen algunos ejemplos de aplicaciones biomédicas. Para aplicaciones en biotecnología los nanotubos ofrecen interesantes ventajas con respecto a las nanopartículas. Por ejemplo presentan grandes volúmenes internos que pueden ser utilizados como sistemas de liberación de fármacos, de cualquier especie química o bioquímica, desde moléculas pequeñas hasta proteínas,<sup>132</sup> hay

<sup>116</sup> Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. Chemistry of carbon nanotubes. *Chemical Reviews* **2006**, *106* (3), 1105-1136.

<sup>131</sup> Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, *9* (6), 674-679.

<sup>132</sup> Martin, C. R.; Kohli, P. The emerging field of nanotube biotechnology. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2* (1), 29-37.

ejemplos de empleo de nanotubos en este sentido con péptidos,<sup>133</sup> ácidos nucleicos<sup>134</sup> y antígenos.<sup>135</sup>

Los nanotubos de carbono se han estudiado ampliamente como portadores de fármacos para dianas moleculares. Dai y colaboradores<sup>136</sup> han estudiado la biodistribución de SWCNTs radiomarcados en ratones *in vivo* por PET y su biodistribución *ex vivo* por espectroscopia Raman.

Los CNTs se emplean también como transportadores de grandes biomoléculas funcionalizadas. Pantarotto y colaboradores<sup>137</sup> describen la funcionalización covalente de epitopos neutralizados de células B del virus de la enfermedad mano-pies-boca a nanotubos mono y bis funcionalizados.

Todavía el mecanismo de captación celular de los nanotubos funcionalizados no está claro del todo, es un problema debatido y existen diferentes hipótesis: Dai y colaboradores<sup>138</sup> proponen un mecanismo de endocitosis basado en la observada dependencia de la temperatura en la captación celular de los CNTs; por otro lado los grupos de Kostarelos, Bianco y Prato, proponen un mecanismo de translocación diferente denominado mecanismo “nanoaguja”.<sup>139</sup> Con el fin de examinar los pasos clave en el proceso de absorción celular, Kostarelos et al<sup>139</sup> han funcionalizado tanto SWCNTs y MWCNTs con una amplia gama de

---

<sup>133</sup> Pantarotto, D.; Briand, J. P.; Prato, M.; Bianco, A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem. Commun.* **2004**, (1), 16-17.

<sup>134</sup> Bianco, A.; Kostarelos, K.; Partidos, C. D.; Prato, M. Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chem. Commun.* **2005**, (5), 571-577.

<sup>135</sup> Kam, N. W. S.; Dai, H. J. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: Generality and biological functionality. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*(16), 6021-6026.

<sup>136</sup> Liu, Z.; Cai, W.; He, L.; Nakayama, N.; Chen, K.; Sun, X.; Chen, X.; Dai, H. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nature Nanotechnology* **2007**, *2*(1), 47-52.

<sup>137</sup> Pantarotto, D.; Partidos, C. D.; Hoebeke, J.; Brown, F.; Kramer, E.; Briand, J. P.; Muller, S.; Prato, M.; Bianco, A. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chemistry & Biology* **2003**, *10*(10), 961-966.

<sup>138</sup> Kam, N. W. S.; Liu, Z. A.; Dai, H. J. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: An investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*(4), 577-581.

<sup>139</sup> Pantarotto, D.; Briand, J. P.; Prato, M.; Bianco, A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem. Commun.* **2004**, (1), 16-17.

<sup>139</sup> Kostarelos, K.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Wu, W.; Wieckowski, S.; Luangsivilay, J.; Godefroy, S.; Pantarotto, D.; Briand, J. P.; Muller, S.; Prato, M.; Bianco, A. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nature Nanotechnology* **2007**, *2*(2), 108-113.

moléculas y especies bioactivas, incluyendo sales de amonio, sondas fluorescentes, medicamentos contra el cáncer, y antibióticos. Todos los nanotubos funcionalizados han sido ensayados en diferentes tipos de células y en todos los casos observan como el paso a través de la barrera celular tiene lugar en la región perinuclear incluso en condiciones de inhibición de la endocitosis. Los autores sugieren que los nanotubos de carbono actúan como nanoagujas que perforan de forma pasiva o penetran en las membranas de muchos tipos diferentes de células; resultados de modelización molecular son consistentes con la hipótesis de la nanoaguja.<sup>140</sup>

También se ha descrito el empleo de biosensores de nanotubos de carbono como transistores de efecto campo (FET). Las propiedades eléctricas peculiares de los CNTs y su sensibilidad a cambios en el entorno que los rodea han hecho de los CNTs ideales componentes en quimio-/biosensores. Los sensores electroquímicos y transistores de efecto campo han sido desarrollados y fabricados en diferentes configuraciones y mecanismos.<sup>141</sup>

Los nanotubos han llamado la atención también por sus propiedades ópticas y por su capacidad de atravesar la membrana celular. La mayoría de los estudios de bioimagen se dividen en dos grupos: imagen directa que se basa en la fluorescencia intrínseca de los nanotubos y la indirecta que utiliza marcadores radioactivos o sondas fluorescentes adheridas a los nanotubos.<sup>142-144</sup>

<sup>140</sup> Lopez, C. F.; Nielsen, S. O.; Moore, P. B.; Klein, M. L. Understanding nature's design for a nanosyringe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*(13), 4431-4434.

<sup>141</sup> Avouris, P.; Chen, Z.; Perebeinos, V. Carbon-based electronics. *Nature Nanotechnology* **2007**, *2*(10), 605-615.

<sup>142</sup> Singh, R.; Pantarotto, D.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Klumpp, C.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*(9), 3357-3362.

<sup>143</sup> Cherukuri, P.; Bachilo, S. M.; Litovsky, S. H.; Weisman, R. B. Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*(48), 15638-15639.

<sup>144</sup> Lacerda, L.; Pastorin, G.; Gathercole, D.; Buddle, J.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K. Intracellular trafficking of carbon nanotubes by confocal laser scanning microscopy. *Advanced Materials* **2007**, *19*(11), 1480-1484.



En esta memoria se plantea el empleo de nanotubos de carbono en imagen biomédica: en principio como posible agentes de contraste para imagen por resonancia magnética y se abre la posibilidad al uso como sondas bifuncionales para fluorescencia.

#### 2.4.6. Toxicidad

Un tema de gran interés y de debate controvertido es la toxicidad de los nanotubos de carbono. Muchos grupos han investigado la toxicidad de los nanotubos de carbono utilizando diferentes estrategias.<sup>143-147</sup> Sin embargo, los resultados preliminares son contradictorios. Esto es principalmente debido al hecho de que parámetros tales como la estructura, distribución de tamaño, estado de aglomeración, funcionalización de la superficie, así como la pureza de la muestra, tienen un impacto considerable sobre las actividades del CNT *in vivo*.

En la actualidad es difícil aislar el efecto del tamaño de los CNTs en la toxicidad debido a la falta de investigación sistemática sobre el tema. Parece que la aglomeración de las partículas en los SWCNTs influya también sobre la citotoxicidad.<sup>148</sup> Sin embargo, dos grupos de investigación obtuvieron resultados diferentes con respecto a la influencia de la aglomeración de los CNTs empleando dos líneas celulares distintos.

Sayes<sup>147</sup> y colaboradores demuestran como la funcionalización de las paredes de los nanotubos tiene un efecto en la toxicidad: al aumentar el grado de funcionalización los nanotubos disminuye su citotoxicidad.

---

<sup>145</sup> Shvedova, A. A.; Castranova, V.; Kisin, E. R.; Schwegler-Berry, D.; Murray, A. R.; Gandelsman, V. Z.; Maynard, A.; Baron, P. Exposure to carbon nanotube material: Assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* **2003**, *66* (20), 1909-1926.

<sup>146</sup> Cui, D. X.; Tian, F. R.; Ozkan, C. S.; Wang, M.; Gao, H. J. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicology Letters* **2005**, *155* (1), 73-85.

<sup>147</sup> Sayes, C. M.; Liang, F.; Hudson, J. L.; Mendez, J.; Guo, W. H.; Beach, J. M.; Moore, V. C.; Doyle, C. D.; West, J. L.; Billups, W. E.; Ausman, K. D.; Colvin, V. L. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicology Letters* **2006**, *161* (2), 135-142.

<sup>148</sup> Warheit, D. B.; Laurence, B. R.; Reed, K. L.; Roach, D. H.; Reynolds, G. A. M.; Webb, T. R. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicological Sciences* **2004**, *77* (1), 117-125.

<sup>147</sup> Sayes, C. M.; Liang, F.; Hudson, J. L.; Mendez, J.; Guo, W. H.; Beach, J. M.; Moore, V. C.; Doyle, C. D.; West, J. L.; Billups, W. E.; Ausman, K. D.; Colvin, V. L.



Las impurezas metálicas también pueden contribuir al efecto citotóxico de los nanotubos.<sup>149</sup> Por ejemplo, CNTs implantados por vía subcutánea con impurezas inducen claramente toxicidad inmunológica y alopecia localizada en ratones, mientras que CNTs extremadamente puros implantados muestran buena biocompatibilidad.

Se requieren por tanto investigaciones sistemáticas en condiciones experimentales comparables tales como: la longitud de la CNT, diámetros; masa; partícula; concentración; sitios defectuosos; reactivos; medios de comunicación; superficie; funcionalización; estados de agregación; aglomeración; impurezas metálica; líneas celulares; animales; vías de administración; punto final de la prueba y los protocolos experimentales. Por tanto, la resolución de esta controversia de seguridad de los CNTs implicará un enorme trabajo experimental futuro.

En la presente memoria se aborda el tema de la citotoxicidad de los SWCNTs.

---

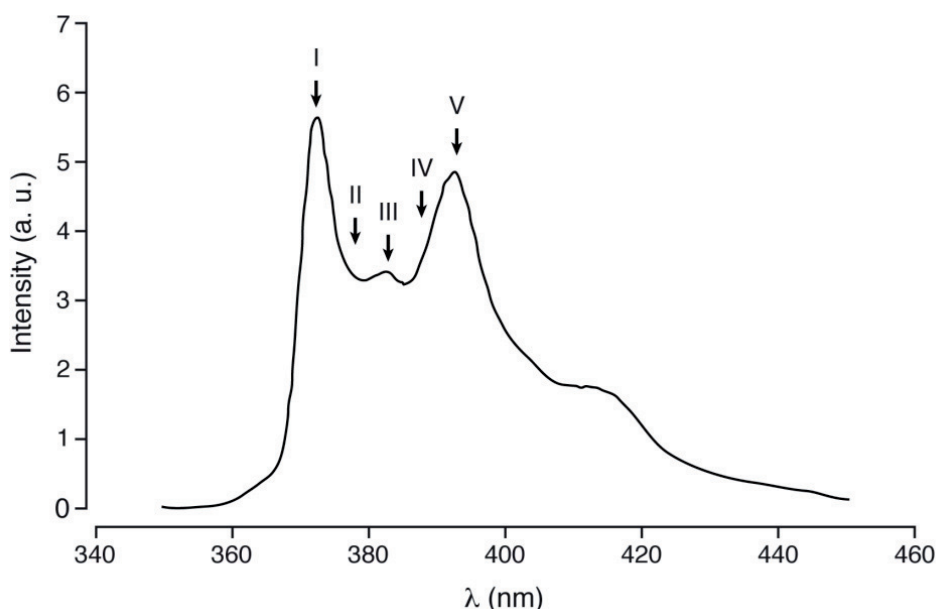
Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicology Letters* **2006**, 161 (2), 135-142.

<sup>149</sup> Murray, A.; Kisin, E.; Leonard, S.; Young, S.; Kommineni, C.; Kagan, V.; Castranova, V.; Shvedova, A. Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology* **2009**, 257 (3), 161-171.

## 2.5. FLUORESCENCIA DE PIRENO

El pireno es un fluoróforo muy conocido, su espectro de fluorescencia varía en función del disolvente, del pH, de la temperatura y de la concentración.

La fluorescencia del pireno exhibe una fuerte dependencia de la polaridad del disolvente. El espectro de pireno en agua (Figura 2.18) muestra cinco picos característicos, el pico I ( $\approx 375$  nm) es más intenso en disolventes polares y la relación entre el pico I y el pico III (383 nm) proporciona información acerca de la polaridad del entorno del fluoróforo, siendo del orden de 0.6 en disolventes apolares y llegando a 1.8 - 1.9 en agua.<sup>150,151</sup>



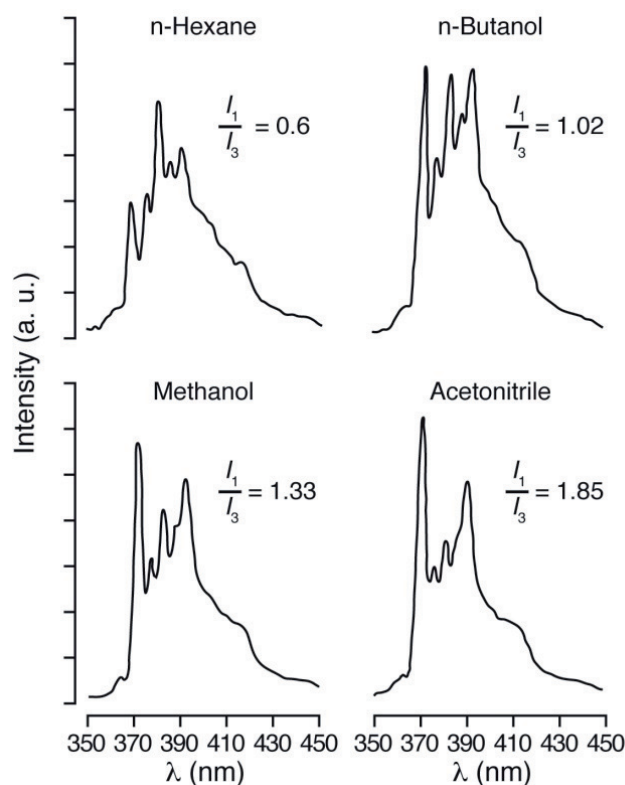
**Figura 2.18.** Espectro de emisión de fluorescencia de pireno en H<sub>2</sub>O, con sus bandas características.<sup>152</sup>

<sup>150</sup> Thomas, J. K. The chemistry of excitation at interfaces. 1984. American Chemical Society. ACS Monograph N 181.

<sup>151</sup> Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, 99 (7), 2039-2044.

<sup>152</sup> Paeng, K. W.; Kim, B. S.; Kim, E. R.; Sohn, D. Aggregation processes of hydrophobically modified polyethylene oxide. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2000**, 21 (6), 623-627.

En la Figura 2.19 se muestran cuatro espectros de emisión de fluorescencia de pireno en disolventes con polaridad distinta: observándose como la relación  $I_1/I_3$  aumenta al aumentar la polaridad del disolvente.



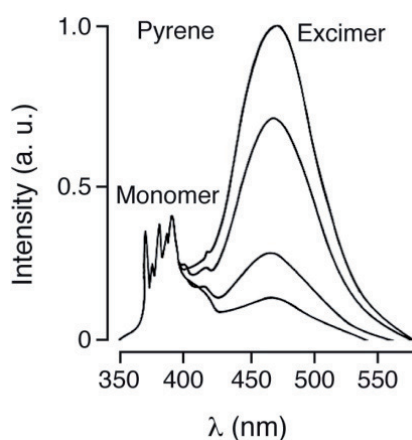
**Figura 2.19.** Dependencia del disolvente en las bandas vibrónicas en los espectros de emisión de fluorescencia de pireno monómero.<sup>150</sup>

El espectro de fluorescencia de pireno muestra bandas vibrónicas correspondientes a transiciones permitidas ( $^1B_{1G}$ ) y prohibidas ( $^1A_g$ ) que incluyen la banda O-O. Los disolventes afectan la intensidad de las bandas vibrónicas prohibidas en transiciones electrónicas débiles. El pico 3 pertenece a una transición fuerte y permitida y muestra variaciones con el disolvente. Por lo contrario la banda 1 (O-O) resulta prohibida en disolventes apolares.

Otro aspecto a destacar en la emisión de fluorescencia de pireno es la concentración: a concentraciones diluidas en el espectro de emisión de

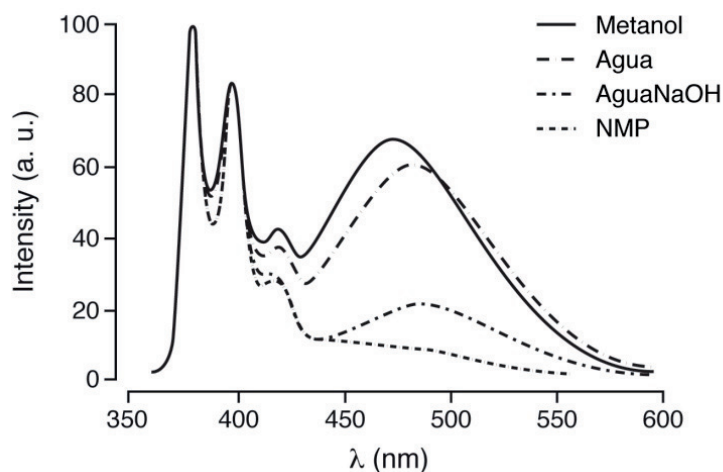
<sup>150</sup> Thomas, J. K. The chemistry of excitation at interfaces. 1984. American Chemical Society. ACS Monograph N 181.

fluorescencia de pireno no aparece la banda en la región entre 450 y 550 nm característica del excímero como se observa en la Figura 2.20.



**Figura 2.20.** Fluorescencia de pireno en forma de monómero y excímero en función de la concentración en disolvente apolar.<sup>153</sup>

La formación del excímero también se ve muy afectada por el medio como se puede observar en el siguiente espectro, cuya banda característica entre 450 y 500 nm varía con el disolvente.



**Figura 2.21.** Espectro de emisión del pireno en forma de monómero y excímero en metanol [—], agua [---], agua/NaOH [---] y [---] NMP, concentración de pireno  $10^{-4}$  M.<sup>154</sup>

<sup>153</sup> Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*; Third ed.; 2006, pag 9.

<sup>154</sup> Turro, N. J.; Arora, K. S. Pyrene As A Photophysical Probe for Intermolecular Interactions of Water-Soluble Polymers in Dilute-Solutions. *Polymer* **1986**, 27 (5), 783-796.

Se ha podido comprobar que en el pireno, como otros policiclos aromáticos, a concentraciones elevadas tiene lugar una reacción entre una molécula de pireno y otra de pireno excitado produciendo un dímero excitado, o excímero, que es el responsable de la fluorescencia de la banda a 500 nm.<sup>155</sup>

El esquema de las reacciones fotofísicas del pireno es:

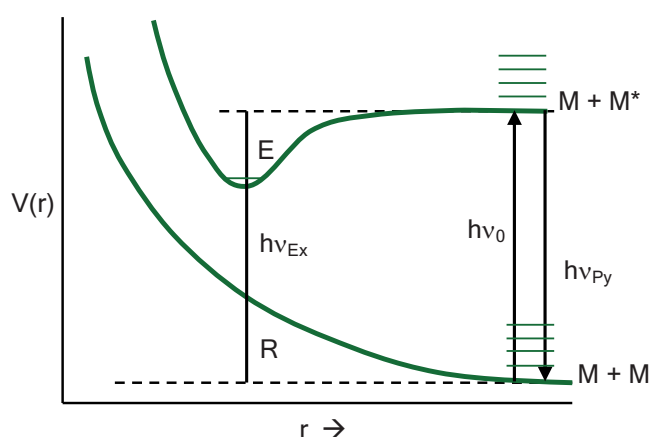


El proceso (1) corresponde a la absorción UV del pireno, el proceso (2) se refiere a la emisión de fluorescencia del monómero. Los procesos (3) y (4), que solo se dan a altas concentraciones de pireno, son las etapas de formación de excímero y su correspondiente desactivación mediante emisión de fluorescencia, respectivamente.

Si se estudia el diagrama de energía potencial de las transiciones electrónicas y la formación del excímero, se puede ver (Figura 2.22) que a separaciones intermoleculares grandes (que ocurren a concentraciones bajas) la transición corresponde al monómero excitado (absorción y fluorescencia). También se indica la implicación de las vibraciones moleculares en estas transiciones. Los espectros de absorción y de fluorescencia del monómero muestran la estructura vibracional (que generalmente incluye un modo de esqueleto), mientras que la emisión del excímero no presenta esta estructura. Esto es característico de las transiciones electrónicas (de absorción o emisión) entre los estados unidos y no unidos.

<sup>155</sup> Dewar, M. J. S.; Dougherty, R. C. *Teoría de las perturbaciones de los orbitales moleculares (PMO) en Química Orgánica*; 1980, pag 519.

El máximo en la emisión del excímero, corresponde a las transiciones entre el mínimo de energía potencial del excímero y las especies no unidas en el estado fundamental del dímero que tendría la misma separación intermolecular que la del excímero. Por lo tanto, la formación del excímero implica la formación de una especie unida después de la absorción de fotones. Conceptualmente, este es el proceso inverso de una fotodisociación, en la que el resultado de la absorción de luz produce la rotura del enlace. Por otra parte, la emisión de fotones en el excímero (fluorescencia) provoca la disociación molecular, ya que en el estado fundamental el par se disocia rápidamente.



**Figura 2.22.** Energía potencial de dos moléculas de pireno en función de la distancia intermolecular. La coordenada  $r$  describe la aproximación de dos moléculas con la orientación adecuada para formar el excímero. La transición de la derecha se refiere al monómero ( $h\nu_{Py}$ ) y la de la izquierda al dímero ( $h\nu_{Ex}$ ).

El diagrama de energía potencial de la **Figura 2.22** permite comparar las energías de emisión del monómero y del dímero en términos de energía de enlace del excímero,  $E$ , y energía de repulsión del estado fundamental,  $R$ :  $h\nu_{Py} = h\nu_{Ex} + E + R$ .

Donde  $h\nu_{Py}$  = representa la energía de fluorescencia del monómero y  $h\nu_{Ex}$  es la energía máxima de fluorescencia del excímero.<sup>156</sup>

<sup>156</sup> Halpern, A.; Mc Bane, G. Experimental Physical Chemistry: a laboratory textbook. 2006. Mac Millan.



## 3. Objetivos

---

“Se vuoi costruire una barca, non radunare uomini per tagliare legna, dividere compiti e impartire ordini, ma insegna loro la nostalgia del mare vasto e infinito.”

Antoine de Saint-Exupery





### 3.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es diseñar, preparar y caracterizar una nueva generación de ACs con propiedades magnéticas anisotrópicas basada en nanotubos de carbono y complejos de Gd(III) derivados de DOTA mono amida.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**3.2.1.** Implementar métodos de modelización molecular para interpretar las propiedades de los CNTs.

- Modelizar interacciones  $\pi-\pi$  entre CNTs y derivados de pireno con métodos computacionales.
- Calcular los coeficientes de difusión del agua en presencia de CNTs mediante dinámica molecular con métodos “all-atoms” y métodos “coarse grained”.

**3.2.2.** Preparar y caracterizar CNTs de longitud controlada.

- Investigar la fragmentación de SWCNTs y MWCNTs mediante procedimientos oxidativos en condiciones ácidas y por ultrasonidos con sonicador de punta.
- Caracterizar las propiedades físico-químicas de CNTs por métodos de fluorescencia, microscopía electrónica de transmisión (TEM), análisis termogravimétricos (TGA), espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopia fotoelectrónica de Rayos X (XPS), fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF), microscopía de Fuerza Atómica (AFM), espectroscopia Raman y mediante un dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID).
- Estudiar la citotoxicidad mediante procedimientos de biorreducción de MTT (Metil Tiazol Tetrazolio) y liberación de LDH (Lactato Deshidrogenasa).

**3.2.3.** Preparar y caracterizar por los métodos físico-químicos indicados anteriormente, los aductos formados por interacciones  $\pi-\pi$  entre los CNTs fragmentados y los derivados de nitro y aminopireno.

**3.2.4** Sintetizar y caracterizar ligandos derivados de pireno con complejos de Gd(III) basados en DOTA mono amida (DOTAma).

- Con un complejo de Gd(III) y con diferentes espaciadores entre pireno y el tetraazamacrociclo.
- Con un complejo de Gd(III) y un anillo aromático unido al pireno.
- Con dos complejos de Gd(III) y un pireno.

**3.2.5.** Preparar aductos por interacciones  $\pi-\pi$  entre los CNTs fragmentados y los complejos de Gd(III) obtenidos en el apartado anterior.

**3.2.6.** Estudiar las propiedades físico-químicas de los ligandos, complejos y aductos obtenidos utilizando las metodologías indicadas anteriormente, con especial atención a sus propiedades de

- Fluorescencia.
- Dispersión de la Relajación de Resonancia Magnética (NMRD).
- Imagen por Resonancia Magnética: Efectos en  $T_1$ ,  $T_2$  y ADC.

## 4. Resultados y Discusión

---

“Siamo lieti di essere perplessi. Si impara di più quando si trovano cose che non si possono spiegare facilmente. Se si osservano fenomeni immediatamente interpretabili, allora è probabile che ci sia poco da imparare e che si tratti di cose che sapevamo già.”

Edward C. Stone



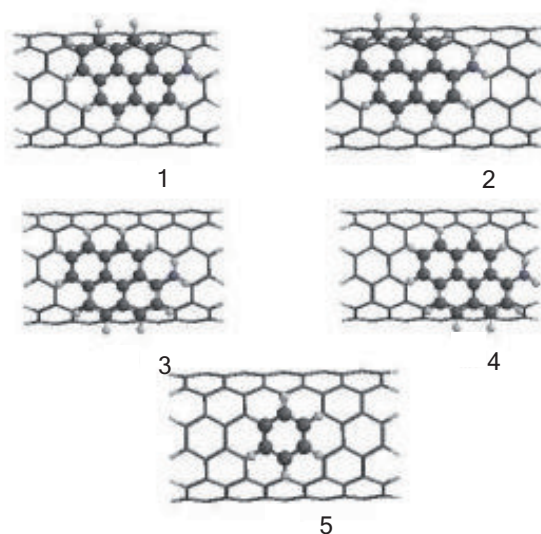
## 4.1. MODELIZACIÓN MOLECULAR

### 4.1.1. Modelización molecular de interacciones $\pi - \pi$ entre nanotubos de carbono y diferentes moléculas aromáticas: benceno, pireno, aminopireno y nitropireno.

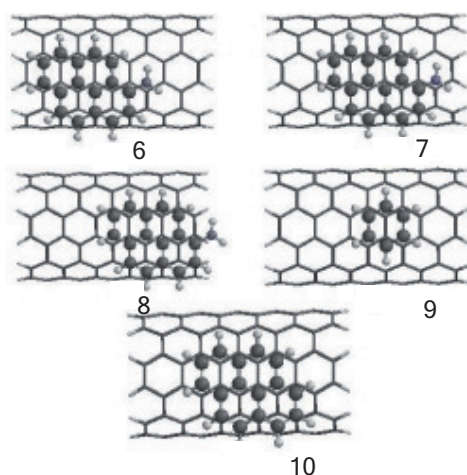
Se han analizado como modelos las interacciones entre nanotubos de carbono (6.6) y diferentes derivados de pireno. Más concretamente, se han construido sistemas con dos posiciones relativas diferentes entre las moléculas aromáticas y el CNT: paralela y perpendicular, calculando sus energías de interacción y la orientación preferida. También se ha estudiado cómo influye el número de ciclos aromáticos, la presencia de grupos funcionales y las posiciones relativas de las moléculas aromáticas con respecto a los CNTs.

#### 4.1.1.1. Resultados Obtenidos

Los sistemas empleados en los cálculos están constituidos por un nanotubo de carbono armchair (6.6) (diámetro=8.1 Å y longitud=12.3 Å) sobre el cual se han posicionado las moléculas aromáticas. Los átomos de C de los extremos del CNT se han saturado con átomos de H. Las propiedades electrónicas de los sistemas se han calculado solo para configuraciones más estables, es decir las de mínima energía. El anillo aromático de las moléculas puede estar dispuesto de forma paralela (Figura 4.1), paralela desplazada (Figura 4.2) y perpendicular (Figura 4.3) con respecto a la superficie del nanotubo.



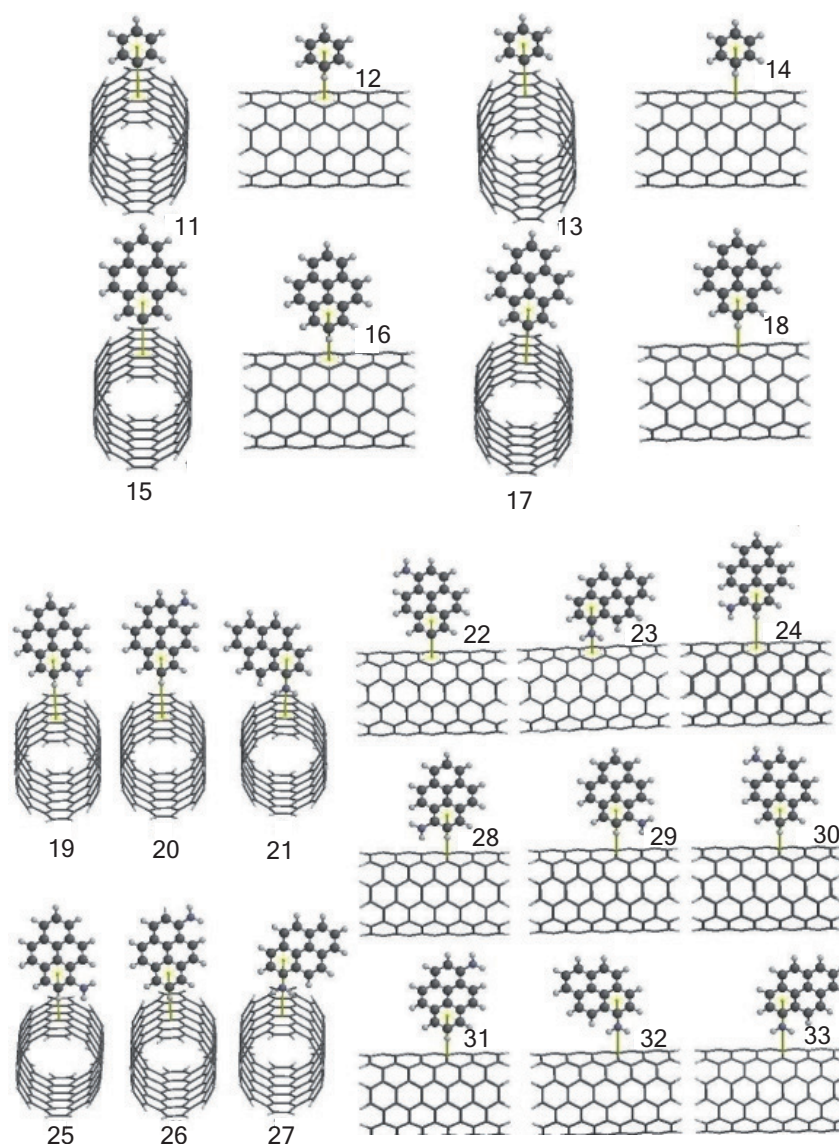
**Figura 4.1.** Configuración paralela



**Figura 4.2.** Configuración paralela desplazada

En la configuración paralela las moléculas aromáticas se disponen de tal forma que los anillos aromáticos se superponen perfectamente con los anillos bencénicos de la pared del CNT.

En la configuración paralela desplazada, los centros de los anillos aromáticos se superponen al centro de uno de los enlaces entre átomos de C del CNT perpendiculares al eje longitudinal del nanotubo. Se han escogido diferentes enlaces C-C de la superficie del CNT, lo que da lugar a las diferentes estructuras que se muestran en la **Figura 4.2**.



**Figura 4.3.** Configuración perpendicular

En la configuración perpendicular las moléculas aromáticas se disponen perpendicularmente al eje longitudinal del CNT.

Una característica común a las diferentes estructuras que interactúan a través de interacciones  $\pi-\pi$ , es que las configuraciones más estables muestran que la orientación de uno de los enlaces  $\pi$  de una molécula dada se orienta de modo centrado y paralelo a dos de los enlaces  $\pi$  del CNT.<sup>157</sup>

La **Tabla 4.1** muestra las configuraciones de menor energía.

<sup>157</sup> Charlier, J. C.; Gonze, X.; Michenaud, J. P. Graphite Interplanar Bonding - Electronic Delocalization and Van-Der-Waals Interaction. *Europhysics Letters* **1994**, *28* (6), 403-408



**Tabla 4.1.** Energías de interacción y distancias nanotubo - molécula de las configuraciones más estables encontradas para cada sistema. Distancia entre el centro de uno de los anillos aromáticos de una molécula al centro de uno de los anillos aromáticos del nanotubo (configuraciones paralelas) o entre el centro de uno de los anillos aromáticos de la molécula y el punto medio de un enlace C-C del CNT, configuraciones paralelas desplazadas. Para las configuraciones perpendiculares las distancias se toman respecto al átomo de la molécula aromática más cercano a la superficie del CNT.

	Moléculas*	Distancia (Å)	Energía de Interacción (kcal/mol)
Aminopireno Configuración Paralela	1	3.35	20.88
	2	3.40	21.15
	3	3.40	21.56
	4	3.45	18.03
Benceno Configuración Paralela	5	3.45	9.14
Aminopireno Configuración Paralela Desplazada	6	3.25	23.37
	7	3.25	23.87
	8	3.55	19.83
Benceno Configuración Paralela Desplazada	9	3.30	10.30
Pireno Configuración Paralela Desplazada	10	3.25	22.28
Benceno Configuración Perpendicular	11	4.85	5.12
	12	4.75	5.52
	13	5.00	3.58
	14	4.95	3.89
Pireno Configuración Perpendicular	15	4.95	6.06
	16	4.75	6.60
	17	4.90	5.06
	18	4.85	5.44
Aminopireno Configuración Perpendicular	19	4.85	4.68
	20	5.00	5.76
	21	6.00	2.91
	22	4.85	6.42
	23	6.00	4.17
	24	4.90	5.47
	25	4.90	3.50
	26	4.95	4.43
	27	6.00	3.00
	28	5.25	3.09
	29	4.95	4.25
	30	4.95	4.50
	31	4.95	5.23
	32	5.95	3.41
	33	6.45	2.51

\* La numeración de las moléculas en la modelización es independiente a la de la síntesis de los compuestos obtenidos.

De estos valores se puede concluir que la adsorción de las moléculas aromáticas sobre la superficie del CNT origina diferentes mínimos locales, resultando algunas orientaciones más favorables que otras.

Hemos encontrado que las configuraciones paralelas desplazadas son más estables en todas las moléculas estudiadas. Estos resultados concuerdan con los encontrados en bibliografía.<sup>158-160</sup> Además, para todas las moléculas estudiadas los valores de las energías de interacción son inferiores cuando las moléculas se disponen de forma perpendicular a la superficie del nanotubo, resultando por tanto en una interacción menos favorable.

La diferencia de energía entre ambas configuraciones aumenta en el orden benceno (3.5-10 kcal/mol) > pireno (16 kcal/mol) > aminopireno (17-20 kcal/mol). Estos efectos concuerdan con trabajos previos que muestran que un aumento en el número de anillos aromáticos, una configuración paralela desplazada y la presencia de grupos funcionales favorecen la interacción.<sup>161-163</sup> Con el aumento del número de anillos aromáticos condensados los compuestos son más  $\pi$ -dadores. Además la presencia del grupo  $\text{NH}_2$  refuerza el carácter donante de electrones de la molécula aromática y fortalece la interacción entre el CNT y el aminopireno ya que un mayor número de anillos aromáticos y la presencia de grupos dadores favorecen la transferencia de una pequeña cantidad de carga de la molécula aromática al CNT.

<sup>158</sup> Tournus, F.; Latil, S.; Heggie, M. I.; Charlier, J. C.  $\pi$ -stacking interaction between carbon nanotubes and organic molecules. *Physical Review B* **2005**, *72* (7).

<sup>159</sup> Stepanian, S. G.; Karachevtsev, V. A.; Glamazda, A. Y.; Dettlaff-Weglikowska, U.; Adamowicz, L. Combined Raman scattering and ab initio investigation of the interaction between pyrene and carbon SWNT. *Molecular Physics* **2003**, *101* (16), 2609-2614.

<sup>160</sup> Zhang, Y.; Yuan, S. L.; Zhou, W. W.; Xu, J. J.; Li, Y. Spectroscopic evidence and molecular simulation investigation of the  $\pi$ - $\pi$  interaction between pyrene molecules and carbon nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2007**, *7* (7), 2366-2375.

<sup>161</sup> Rubes, M.; Bludsky, O.; Nachtigall, P. Investigation of the benzene-naphthalene and naphthalene-naphthalene potential energy surfaces: DFT/CCSD(T) correction scheme. *Chemphyschem* **2008**, *9* (12), 1702-1708.

<sup>162</sup> Zhao, Y.; Truhlar, D. G. How well can new-generation density functionals describe the energetics of bond-dissociation reactions producing radicals? *Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112* (6), 1095-1099.

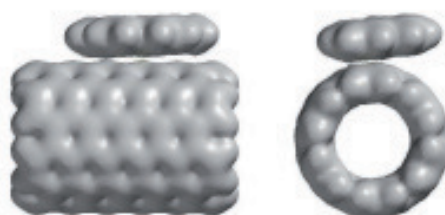
<sup>163</sup> Woods, L. M.; Badescu, S. C.; Reinecke, T. L. Adsorption of simple benzene derivatives on carbon nanotubes. *Physical Review B* **2007**, *75* (15).

**Tabla 4.2.** Cargas de CNTs calculadas para diferentes aductos molécula aromática/nanotubo de carbono.

	Moléculas	Moléculas	Carga en CNT
Configuración Paralela	Benceno	5	-0.004
		9	-0.006
	Pireno	10	-0.019
	Aminopireno	3	-0.024
		7	-0.026

Todo ello sugiere que las interacciones  $\pi$ - $\pi$  constituyen la contribución más importante durante el proceso de adsorción de este tipo de moléculas sobre los nanotubos de carbono.

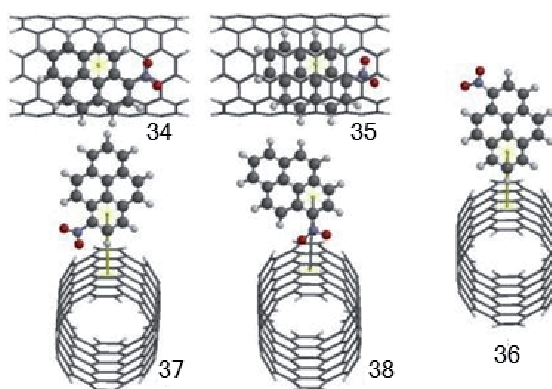
Para comprender mejor la naturaleza de la interacción entre las moléculas aromáticas y el nanotubo se han calculado las superficies de densidad electrónica. La **Figura 4.4** muestra como ejemplo la superficie de densidad electrónica para la molécula 7 de la **Figura 4.2**.

**Figura 4.4.** Superficie de densidad electrónica para la molécula 7.

Se observa una distribución de carga homogénea alrededor de cada una de las moléculas, así como ausencia de carga entre ambas lo que indica que no se forman enlaces de tipo covalente. La densidad de carga del aducto es una simple superposición de las densidades de carga de la molécula aromática y el nanotubo considerados de forma aislada. Teniendo en cuenta los resultados de las pequeñas transferencias de carga y la ausencia de formación de enlaces covalentes se piensa que solamente las interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  explican los valores de energías de adsorción presentes en estos sistemas.

También se ha investigado la energía de interacción entre el nitropireno, que es un aceptor de electrones, con un CNT (6.6). El objetivo de estos cálculos es verificar cómo influye la naturaleza del grupo funcional presente en la molécula aromática en la interacción con el nanotubo.

Las configuraciones utilizadas se muestran en la Figura 4.5 y las energías de interacción calculadas se recogen en la Tabla 4.3.



**Figura 4.5.** Configuraciones paralela (34), paralela desplazada (35) y perpendiculares (36-38) para nitropireno.

**Tabla 4.3.** Energías de interacción, distancias CNT - nitropireno en las diferentes configuraciones del sistema CNT-nitropireno

	Moléculas	Distancia (Å) <sup>a</sup>	Energía de Interacción (kcal/mol)
Configuración Paralela	34	3.45	21.78
Configuración Paralela Desplazada	35	3.25	23.78
Configuración Perpendicular	36	4.85	6.40
	37	5.10	7.05
	38	6.50	13.36

Las conclusiones que se obtienen del análisis de los valores de esta tabla son similares a los del resto de las moléculas aromáticas. La configuración paralela desplazada sigue siendo la más estable y la presencia del grupo nitro favorece la interacción con el CNT, observándose unas energías de orden similar a las obtenidas para el aminopireno.

Se han realizado cálculos *ab initio* de DFT para estudiar la naturaleza de la interacción entre varias moléculas aromáticas y un CNT (6.6). Los resultados de la energía de interacción de la transferencia de carga y de la distribución de la densidad electrónica muestran también que la principal interacción es de tipo  $\pi-\pi$ . De nuevo las configuraciones más favorables son las paralelas desplazadas en todos los sistemas. Aumentando el número de anillos aromáticos condensados de los compuestos se hacen más  $\pi$  dadores y la fuerza de la interacción aumenta. Además la introducción de un grupo funcional con átomos dadores o aceptores electrónicos también favorece la interacción entre la molécula aromática y el nanotubo.

Las orientaciones perpendiculares son menos favorables y la energía de adsorción aumenta al incrementarse la distancia entre la superficie del CNT y el átomo de N del grupo funcional. Cuando se introduce un grupo nitro en el anillo pirénico se obtienen cualitativamente los mismos resultados: las configuraciones paralelas desplazadas son más favorables que las perpendiculares. El análisis de las energías de adsorción muestra que la fuerza de la interacción es similar para las moléculas nitro y aminopireno (molécula 35:  $E=23.78$  kcal/mol, molécula 7:  $E=23.87$  kcal/mol). Estos resultados deben ser considerados aún como preliminares ya que para ninguna de las configuraciones se han realizado verdaderas optimizaciones de la geometría. Tan solo ha sido posible variar las distancias entre el CNT y las moléculas aromáticas, debido a que el elevado número de átomos de estos sistemas supone que una optimización completa de la estructura llevaría asociado un costo computacional inasumible por nosotros en las presentes circunstancias.

En resumen, las simulaciones realizadas nos indican que las interacciones entre moléculas aromáticas y la superficie de CNT son de tipo  $\pi-\pi$ . Las configuraciones más favorables son las paralelas desplazadas en todos los casos, en el caso de las configuraciones perpendiculares la energía de interacción disminuye al aumentar la distancia entre molécula y CNT. Tanto el incremento de anillos aromáticos como la introducción de un

grupo funcional, bien dador o aceptor de electrones, favorece la interacción entre los dos sistemas.

### 4.1.2. Cálculo de coeficientes de difusión mediante dinámica molecular

#### 4.1.2.1. Métodos “all-atoms”

Para estudiar la anisotropía de la difusión previamente demostrada por nuestro grupo mediante medidas experimentales,<sup>164</sup> hemos calculado los coeficientes de difusión de moléculas de agua en presencia de nanotubos de carbono sin funcionalizar, y funcionalizados con moléculas de aminopireno. Con este fin, hemos utilizado métodos de dinámica molecular “all-atoms”, que considera todos los átomos del sistema. Las Figura 4.6 A y B muestran algunos de los sistemas utilizados en los cálculos.

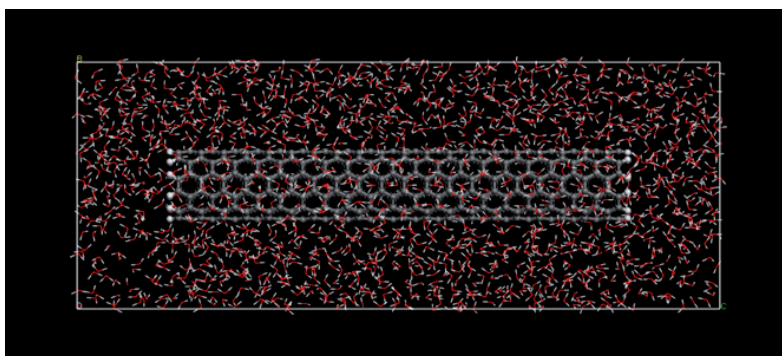


Figura 4.6 A. Modelo utilizado en cálculos de coeficientes de difusión de agua: un nanotubo

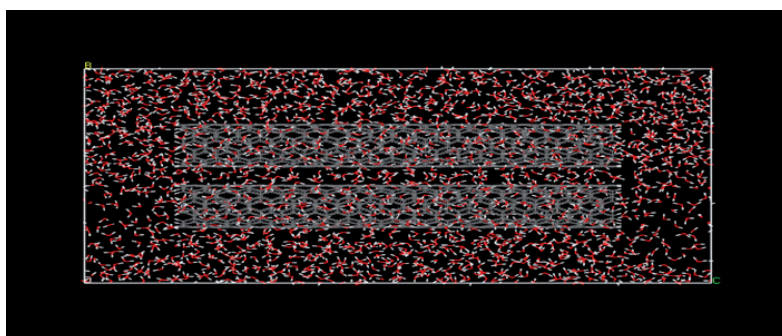


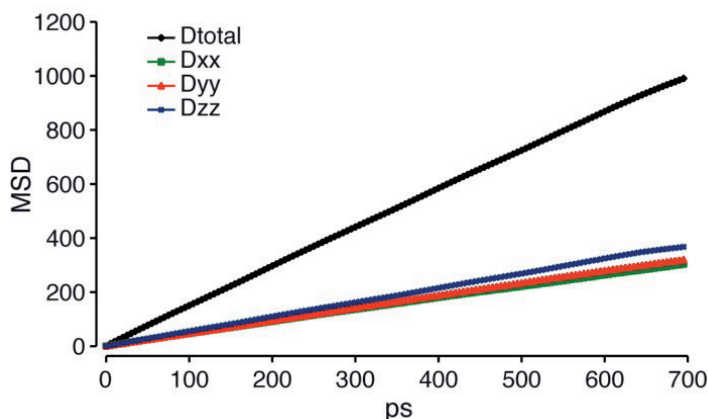
Figura 4.6 B. Modelos usados en cálculos de coeficientes de difusión de agua: dos nanotubos

<sup>164</sup> Negri, V.; Cerpa, A.; Lopez-Larrubia, P.; Nieto-Charques, L.; Cerdan, S.; Ballesteros, P. Nanotubular Paramagnetic Probes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging Based on the Diffusion Tensor. *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, *49*(10), 1813-1815.

Para calcular los coeficientes de difusión se determina el desplazamiento cuadrático medio (MSD) de las moléculas de agua durante el tiempo de duración de la simulación (tiempo de difusión). En el caso de un mecanismo de difusión tipo Fick, se establece una relación lineal entre el MSD y el valor del coeficiente de difusión según la expresión:

$$MSD = \sum_{i=1}^N \left\langle \left( r_i(t) - r_i(0) \right)^2 \right\rangle \approx D * t \quad \text{Ecuación 4.1}$$

Es decir, representando MSD frente al tiempo de difusión se obtiene el valor del coeficiente de difusión a partir de la pendiente de la recta que los relaciona. En la **Figura 4.7** se muestran los valores de MSD para todas las moléculas de agua del sistema según las tres direcciones, x, y, z para un solo nanotubo sin funcionalizar. La dirección z es la dirección del eje del nanotubo.



**Figura 4.7.** Desplazamiento cuadrático medio de todas las moléculas de agua del sistema (dentro y fuera del nanotubo) para un CNT sin funcionalizar.

La **Tabla 4.4** detalla los resultados obtenidos en formato numérico. Con fines comparativos, las dos primeras filas de la tabla muestran también los valores experimental y calculado de los coeficientes de difusión de moléculas de agua en ausencia de nanotubos.

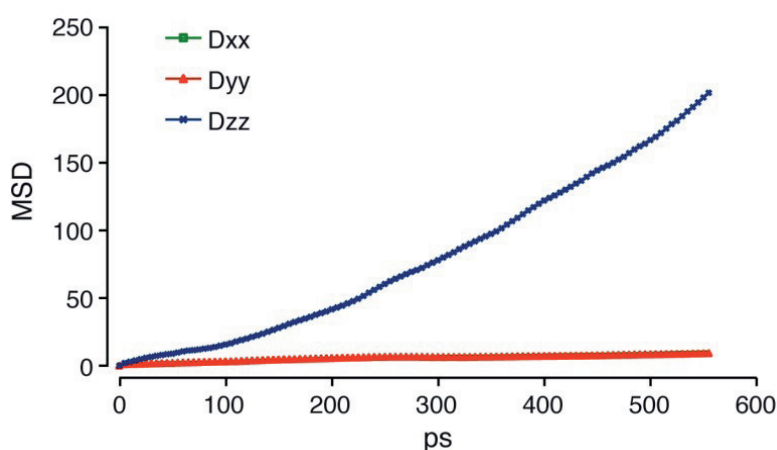
Los resultados indican que las moléculas de agua se desplazan a mayor velocidad en la dirección del eje longitudinal del CNT (eje z), que la

presencia de nanotubos hace disminuir el valor del coeficiente de difusión y que el mecanismo de difusión se puede describir mediante el modelo de Fick. Dicha disminución es más acusada en los modelos que contienen dos nanotubos de carbono.

**Tabla 4.4.** Coeficientes de difusión de agua total.

Sistema	D (cm <sup>2</sup> /s)	Dxx (cm <sup>2</sup> /s)	Dyy (cm <sup>2</sup> /s)	Dzz (cm <sup>2</sup> /s)
Agua (exp.)	2.30 10 <sup>-5</sup>			
Agua (calc.)	2.50 10 <sup>-5</sup>	8.40 10 <sup>-6</sup>	8.31 10 <sup>-6</sup>	8.23 10 <sup>-6</sup>
CNT (6, 6)	2.30 10 <sup>-5</sup>	7.23 10 <sup>-6</sup>	7.70 10 <sup>-6</sup>	8.91 10 <sup>-6</sup>
CNT (6, 6)+ 2 AP	2.41 10 <sup>-5</sup>	7.70 10 <sup>-6</sup>	7.88 10 <sup>-6</sup>	9.16 10 <sup>-6</sup>
2 CNT (6, 6)	1.92 10 <sup>-5</sup>	5.70 10 <sup>-6</sup>	6.44 10 <sup>-6</sup>	6.98 10 <sup>-6</sup>
2CNT (6, 6)+ 19 AP	1.99 10 <sup>-5</sup>	5.36 10 <sup>-6</sup>	6.90 10 <sup>-6</sup>	8.05 10 <sup>-6</sup>

También hemos realizado estudios del coeficiente de difusión de las moléculas de agua que se encuentran en el interior de los CNTs. La **Figura 4.8** representa el MSD de las moléculas de agua en el interior de un nanotubo de carbono sin funcionalizar. Se observa que la gráfica no es lineal, lo que indica un mecanismo de difusión diferente al mecanismo Fick.

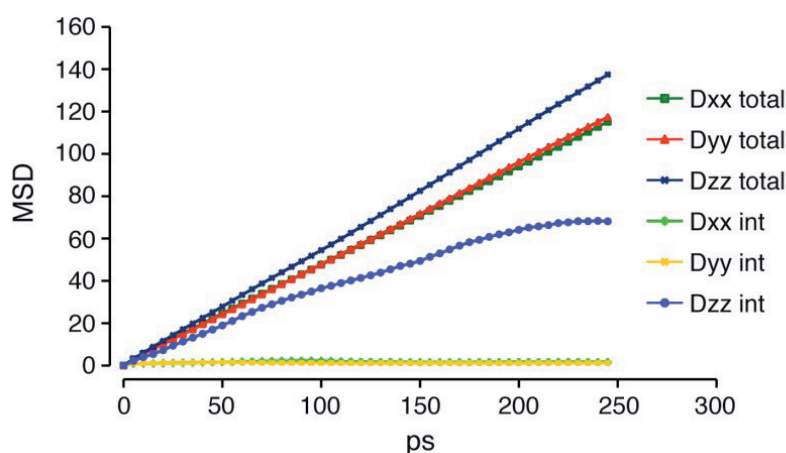


**Figura 4.8.** Desplazamiento cuadrático medio de las moléculas de agua dentro de un CNT sin funcionalizar.



El movimiento en las direcciones perpendiculares al eje del nanotubo (x, y) se ve impedido ( $MSD=0$ ) y solo se observa difusión en la dirección del eje del nanotubo.

En la **Figura 4.9** y con fines comparativos, se muestran los valores de MSD para el agua total y agua interna en el caso de un nanotubo funcionalizado con dos moléculas de aminopireno. De nuevo se observa la anisotropía de MSD (y por tanto, del coeficiente de difusión), tanto en el agua interna como en el agua externa, siendo los valores de MSD más elevados en la dirección del eje longitudinal del nanotubo. Además, se aprecia claramente como el agua total se mueve más rápido que el agua interna, valores de MSD superiores. En resumen los nanotubos actúan como barrera que impide el libre movimiento de las moléculas de agua en las distintas direcciones del espacio causando anisotropía en los valores de D.



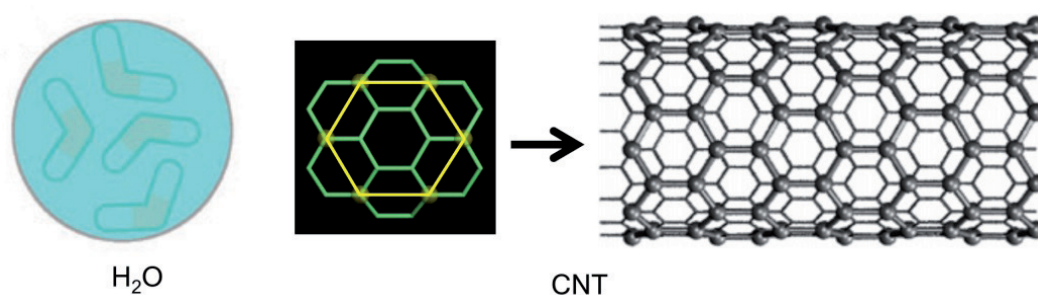
**Figura 4.9.** Desplazamiento cuadrático medio de las moléculas de agua total y agua dentro del CNT funcionalizado con dos moléculas de aminopireno.

No se han podido calcular los coeficientes de difusión del agua dentro de los CNT ya que el desplazamiento cuadrático medio no sigue una variación lineal con el tiempo, al menos en los 1000 ps que dura la simulación, aunque los menores desplazamientos cuadráticos medios (ver **Figura 4.8** y **Figura 4.9**) ponen de manifiesto que el agua se mueve con mayor lentitud en el interior que en exterior del CNT.

En resumen, los resultados obtenidos en todos los modelos son similares. En general, el agua fuera del CNT se desplaza más rápido que el agua en su interior y en todos los casos se observa que el MSD es mayor a lo largo del eje longitudinal del CNT.

#### 4.1.2.2. Métodos “Coarse Grained”

Los cálculos realizados con métodos “all-atoms” ponen de manifiesto que para poder obtener una descripción más realista de los sistemas es necesario utilizar modelos con un gran número de átomos y tiempos de simulación más largos. El principal problema encontrado son los elevadísimos tiempos de cálculo que suponen las simulaciones en estas condiciones. Para resolver esto se han utilizado las llamadas simulaciones “coarse-grained”, donde grupos de átomos son reemplazados por “sitios de interacción efectivos”. De este modo, se pierden ciertos detalles de la estructura atómica pero se consiguen tiempos de cálculo mucho más cortos. La Figura 4.10 ilustra los modelos utilizados en estos cálculos. Una partícula “coarse-grained” de agua representa a 4 moléculas de agua. En el caso de los nanotubos, cada partícula coarse-grained sustituye a 7 anillos aromáticos del nanotubo real.



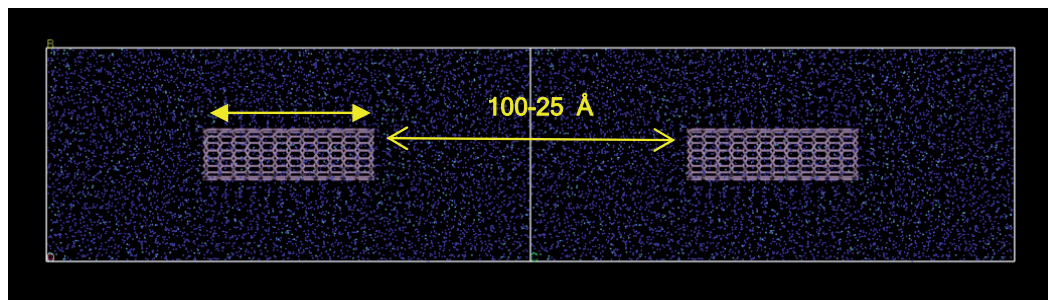
**Figura 4.10.** Modelos “coarse-grained” utilizados para representar el agua y los nanotubos.

El cálculo de los coeficientes de difusión se realiza siguiendo el mismo procedimiento que para los cálculos “all-atoms”: se determina el MSD de las moléculas de agua

Los modelos utilizados consisten en nanotubos de carbono de diámetro 15 Å, de longitud variable (50 -125 Å), con un número de nanotubos de 1 a

4 y distancia entre nanotubos de carbono de distintas celdas entre 15 y 100 Å.

La Figura 4.11 muestra el modelo empleado en los cálculos “coarse-grained” en el caso de una celda constituida por un nanotubo.



**Figura 4.11.** Modelo utilizados en las simulaciones “coarse-grained”: ejemplo de celda con un nanotubo.

La Tabla 4.5 presenta los valores de los coeficientes de difusión en función de la longitud del nanotubo así como las distancias entre nanotubos de diferentes celdas en las direcciones x, y, z. Cuando se mantienen fijas las dimensiones de la celda y se aumenta la longitud del nanotubo se produce una disminución de la distancia entre los nanotubos en el eje z. En las dos primeras filas se muestran los valores del coeficiente de difusión calculados para el agua sola y para el agua mezclada con un 10% de partículas de anticongelante. Es necesario hacer notar que los valores de los coeficientes de difusión calculados en las simulaciones coarse-grained son menores que los valores reales, ya que la masa de las partículas implicadas es mayor. En estos casos se trata más de hacer comparaciones de resultados, que evaluar los valores absolutos de los coeficientes de difusión. El hecho de introducir un anticongelante en el sistema (partículas que en su interacción con los nanotubos se comportan como moléculas de agua) es debido a que uno de los fallos del modelo empleado con los cálculos “coarse grained”, el modelo MARTINI<sup>165,166</sup> es que tiende a

<sup>165</sup> Marrink, S. J.; de Vries, A. H.; Mark, A. E. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (2), 750-760.

<sup>166</sup> Marrink, S. J.; Risselada, H.; Yefimov, S.; Tieleman, D.; de Vries, A. H. The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111* (27), 7812-7824.

congelar las posiciones de las moléculas de agua cuando ésta se halla en geometrías confinadas. Los primeros cálculos, efectuados sin anticongelante, mostraban que el agua en el interior de los nanotubos cristalizaba, inmovilizándose y originando un MSD nulo. Resulta, por tanto, necesario utilizar el “anticongelante” para permitir el movimiento de las moléculas de agua. Sin embargo, se observa también que la introducción de anticongelante, aunque evita la cristalización de las moléculas, hace disminuir todavía más el coeficiente de difusión (comparar los valores de las dos primeras filas de la **Tabla 4.4**)

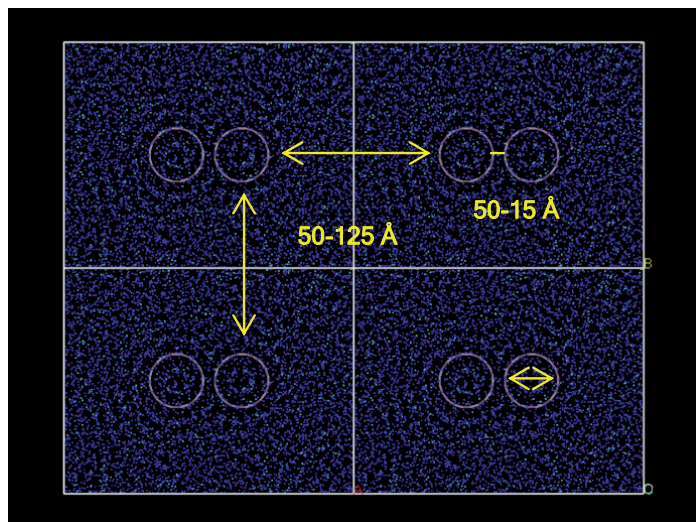
**Tabla 4.5.** Coeficientes de difusión de agua total para un sistema con un CNT.

Sistema	D (cm <sup>2</sup> /s)	Dxx(cm <sup>2</sup> /s)	Dyy (cm <sup>2</sup> /s)	Dzz(cm <sup>2</sup> /s)
Agua	1.86 10 <sup>-5</sup>	0.62 10 <sup>-5</sup>	0.63 10 <sup>-5</sup>	0.61 10 <sup>-5</sup>
Agua + 10% Anticongelante	3.90 10 <sup>-6</sup>	1.31 10 <sup>-6</sup>	1.30 10 <sup>-6</sup>	1.27 10 <sup>-6</sup>
1 CNT, L=50Å distancias CNT: 50, 50, 100	2.71 10 <sup>-6</sup>	0.90 10 <sup>-6</sup>	0.92 10 <sup>-6</sup>	0.88 10 <sup>-6</sup>
1 CNT, L=100Å distancias CNT: 50, 50, 50	1.94 10 <sup>-6</sup>	0.64 10 <sup>-6</sup>	0.65 10 <sup>-6</sup>	0.66 10 <sup>-6</sup>
1 CNT, L=125Å distancias CNT: 50, 50, 25	1.45 10 <sup>-6</sup>	0.47 10 <sup>-6</sup>	0.47 10 <sup>-6</sup>	0.50 10 <sup>-6</sup>

En la tabla se observa que al aumentar la longitud del nanotubo y disminuir la distancia entre nanotubos en el eje z, disminuye el valor del coeficiente de difusión. No se observa anisotropía en función de las direcciones, posiblemente debido a que las distancias entre nanotubos son lo suficientemente grandes como para permitir el libre movimiento de las moléculas de agua (la menor distancia estudiada en este caso es de 25 Å). Además, en estos modelos el porcentaje de moléculas de agua interna es pequeño comparado con el del agua externa, y es posible que predomine el efecto de esta última en los valores calculados del coeficiente de difusión.

La **Figura 4.12** muestra un modelo utilizado en las simulaciones “coarse grained” en celdas con dos nanotubos. La distancia entre nanotubos de

carbono de una misma celda se fija en  $3.347 \text{ \AA}$ , que es aproximadamente la distancia de equilibrio entre capas en el grafito y las distancias entre CNTs de diferentes celdas varía como en el modelo anterior entre 50 y  $125 \text{ \AA}$ .



**Figura 4.12.** Modelo utilizado en las simulaciones “coarse-grained”: celda con dos nanotubos.

En la **Tabla 4.6** se muestra el mismo estudio pero utilizando modelos con dos nanotubos de carbono. Las conclusiones son las mismas, pero se observan valores más pequeños de  $D$ .

**Tabla 4.6.** Coeficientes de difusión de agua total para un sistema con dos CNT's.

Sistema	$D \text{ (cm}^2/\text{s)}$	$D_{xx} \text{ (cm}^2/\text{s)}$	$D_{yy} \text{ (cm}^2/\text{s)}$	$D_{zz} \text{ (cm}^2/\text{s)}$
2 CNT, $L=50 \text{ \AA}$ distancias CNT: 50, 50, 100	$2.21 \cdot 10^{-6}$	$0.75 \cdot 10^{-6}$	$0.76 \cdot 10^{-6}$	$0.73 \cdot 10^{-5}$
2 CNT, $L=100 \text{ \AA}$ distancias CNT: 50, 50, 50	$0.91 \cdot 10^{-6}$	$0.31 \cdot 10^{-6}$	$0.31 \cdot 10^{-6}$	$0.31 \cdot 10^{-6}$
2 CNT, $L=125 \text{ \AA}$ distancias CNT: 50, 50, 25	$0.53 \cdot 10^{-6}$	$0.16 \cdot 10^{-6}$	$0.16 \cdot 10^{-6}$	$0.16 \cdot 10^{-6}$

Para estudiar la influencia de la distancia entre nanotubos, se fija la longitud del nanotubo ( $100 \text{ \AA}$ ) y se varía la distancia en la dirección  $x$ , manteniendo constantes las distancias en las otras dos direcciones ( $50 \text{ \AA}$ ). Los resultados se muestran en la **Tabla 4.7**.

**Tabla 4.7.** Coeficientes de difusión de agua total para un sistema con dos CNT's de longitud 100 Å y distancias variables en el eje x.

Sistema	D (cm <sup>2</sup> /s)	Dxx(cm <sup>2</sup> /s)	Dyy (cm <sup>2</sup> /s)	Dzz(cm <sup>2</sup> /s)
2 CNT, L=100Å distancias CNT: 50, 50, 50	0.91 10 <sup>-6</sup>	0.31 10 <sup>-6</sup>	0.31 10 <sup>-6</sup>	0.31 10 <sup>-6</sup>
2 CNT, L=100Å distancias CNT: 31,5, 50, 50	0.57 10 <sup>-6</sup>	0.19 10 <sup>-6</sup>	0.19 10 <sup>-6</sup>	0.19 10 <sup>-6</sup>
2 CNT, L=100Å distancias CNT: 15, 50, 50	0.16 10 <sup>-6</sup>	0.06 10 <sup>-6</sup>	0.05 10 <sup>-6</sup>	0.05 10 <sup>-6</sup>

De nuevo, no se observa en este caso anisotropía en el coeficiente de difusión del agua total, pero sí una disminución del mismo al disminuir la distancia entre nanotubos.

El efecto del número de nanotubos de carbono se presenta en la **Tabla 4.8**. La longitud del nanotubo se fijó en 100 Å y la distancia entre nanotubos en los tres ejes en 50 Å. El número de nanotubos utilizados es 1, 2 y 4.

**Tabla 4.8.** Coeficientes de difusión de agua total para un sistema con uno, dos o cuatro CNT's de longitud 100 Å y distancias 50 Å entre nanotubos en las direcciones x, y, z

Sistema	D (cm <sup>2</sup> /s)	Dxx(cm <sup>2</sup> /s)	Dyy (cm <sup>2</sup> /s)	Dzz(cm <sup>2</sup> /s)
1 CNT, L=100Å distancias CNT: 50, 50, 50	1.94 10 <sup>-6</sup>	0.64 10 <sup>-6</sup>	0.65 10 <sup>-6</sup>	0.66 10 <sup>-6</sup>
2 CNT, L=100Å distancias CNT: 50, 50, 50	0.64 10 <sup>-6</sup>	0.23 10 <sup>-6</sup>	0.22 10 <sup>-6</sup>	0.21 10 <sup>-6</sup>
4 CNT, L=100Å distancias CNT:	0.23 10 <sup>-6</sup>	0.09 10 <sup>-6</sup>	0.07 10 <sup>-6</sup>	0.10 10 <sup>-6</sup>

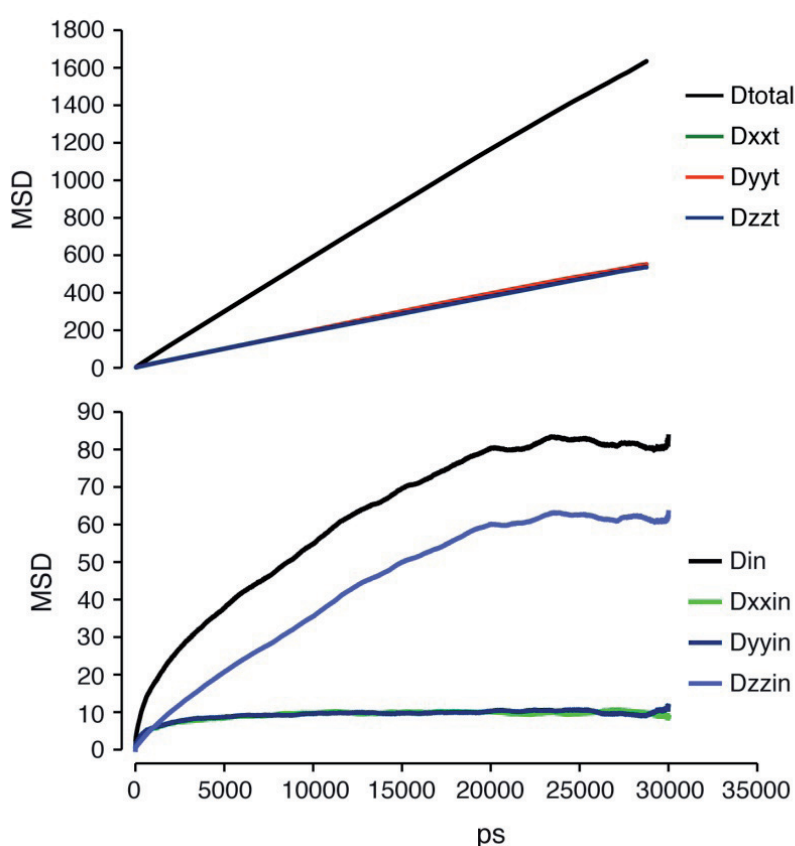
Las conclusiones son similares a las de los anteriores apartados, siendo el sistema con mayor número de nanotubos donde se observa un valor menor para el coeficiente de difusión.

También se hizo un estudio del coeficiente de difusión de las moléculas de agua en el interior de los nanotubos. Por motivos de simplicidad, solo se presentan los resultados para uno de los modelos (**Figura 4.13**), dado que los resultados son similares en todos los casos: los MSD de las moléculas de



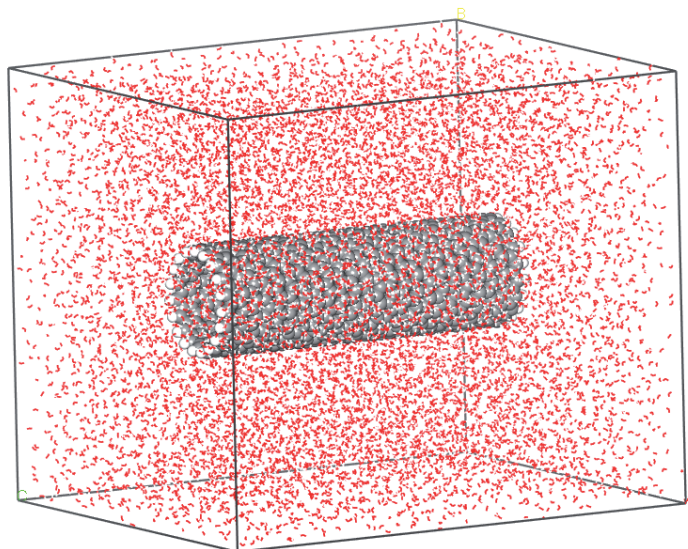
agua interna son más pequeños que los del agua total (internas + externas), el comportamiento de MSD no es lineal con el tiempo y se observa una clara anisotropía, siendo  $D$  elevado en la dirección del eje del nanotubo ( $z$ ) y prácticamente cero en las direcciones perpendiculares al eje del nanotubo.

En resumen los cálculos “coarse grained” muestran una difusión no anisotrópica para las moléculas de agua externas al CNT y una difusión anisotrópica para las moléculas en el interior del CNT.



**Figura 4.13.** Desplazamiento cuadrático medio de las moléculas de agua total (panel superior) y agua interna (panel inferior) de dos CNTs de longitud 100 y distancia entre nanotubos ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ) igual a 50 Å.

Debido al aparente resultado contradictorio de los cálculos “coarse grained” para el agua total, se decide volver a calcular mediante métodos “all atoms” la difusión del agua empleando un modelo con un nanotubo (10.0), se explicitan los detalles experimentales en el apartado 6.3.2.1.



**Figura 4.14.** Modelo utilizado en las simulaciones “all-atoms”.

**Tabla 4.9.** Coeficientes de difusión “all-atoms” de agua total para un sistema conteniendo un CNT (10, 0).

Sistema	D (cm <sup>2</sup> /s)	Dxx(cm <sup>2</sup> /s)	Dyy (cm <sup>2</sup> /s)	Dzz(cm <sup>2</sup> /s)
Agua	2.50 10 <sup>-5</sup>	8.55 10 <sup>-6</sup>	8.31 10 <sup>-6</sup>	8.26 10 <sup>-6</sup>
Agua + CNT (10.0)	2.08 10 <sup>-5</sup>	1.07 10 <sup>-5</sup>	1.07 10 <sup>-5</sup>	1.20 10 <sup>-5</sup>

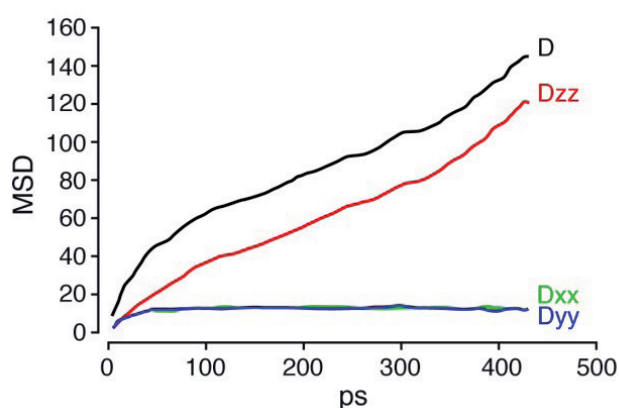
La primera conclusión que se puede extraer de la **Tabla 4.9** es que los valores obtenidos para el agua pura son muy parecidos al valor experimental ( $2.30 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s), lo cual confirma que el campo de fuerzas elegido para el agua es el adecuado. Los valores que se obtienen para el sistema agua-nanotubo son claramente superiores a los obtenidos para el modelo coarse-grained. También se observa que la presencia del nanotubo dificulta el movimiento de las moléculas de agua, haciendo disminuir los valores de los coeficientes de difusión.

En la tabla se puede apreciar además que, a diferencia de los modelos “coarse-grained”, la presencia del nanotubo sí que altera el movimiento de difusión del agua según las direcciones e, incluso para el agua total, es posible observar una pequeña anisotropía en los valores del coeficiente de difusión, siendo más grande en la dirección del eje del nanotubo (eje z) que



en las direcciones perpendiculares (x, y). De este modo, es posible concluir que los modelos “coarse-grained” no representan adecuadamente el comportamiento de anisotropía del agua total en estos sistemas.

La variación del desplazamiento cuadrático medio (MSD) de las moléculas de agua del interior del CNT se muestra en la **Figura 4.15**. En este caso y al igual que en las simulaciones coarse-grained, no se ha podido calcular el coeficiente de difusión ya que el mecanismo de difusión se desvía de modo apreciable de un comportamiento tipo Fick.



**Figura 4.15.** MSD frente al tiempo de agua interna para un sistema conteniendo un CNT (10.0).

En este caso, los resultados son coincidentes con los obtenidos mediante las simulaciones coarse-grained, aunque los valores de MSD son claramente superiores y, posiblemente, más realistas. Lo que se observa claramente es el comportamiento anisotrópico del movimiento de las moléculas de agua en el interior del CNT. El desplazamiento en las direcciones perpendiculares al eje (direcciones x, y) se ve claramente impedido y es el movimiento en la dirección z, lo largo del eje del nanotubo, el que hace la mayor contribución al valor de MSD total.

En resumen, tanto los cálculos “all-atoms” como los “coarse-grained”, ponen de manifiesto que el agua dentro de los nanotubos se mueve más lentamente que el agua fuera, que el mecanismo de difusión del agua interna no sigue el modelo de Fick y que la difusión global es claramente anisótropa.

El efecto de la presencia de los CNT's en el agua externa es confirmado en los modelos "all-atoms" que ponen de manifiesto la existencia de anisotropía, que no se observa en los modelos "coarse-grained". De todos estos resultados se deduce que el modelo "coarse-grained" no resulta completamente satisfactorio para reproducir la dinámica global del agua en estos sistemas, ya que es incapaz de reproducir la anisotropía del coeficiente de difusión. Una posible explicación es que en estos últimos modelos el porcentaje relativo de agua "bulk" es muy grande, las dimensiones de los sistemas y la distancia entre CNT's son mucho mayores y el comportamiento del sistema está dominado por el agua externa, que no se ve afectada, en estas condiciones, por la presencia de los nanotubos. Por otro lado, resulta evidente que el agrupamiento de varias moléculas de agua en una única unidad de difusión introduce importantes modificaciones en la difusión browniana del agua.

## 4.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CNTs DE LONGITUD CONTROLADA

Los nanotubos de carbono existen en forma de pared sencilla y múltiple y en ambos casos, durante su producción, se obtienen nanotubos de longitudes muy variadas, del orden de micrómetros. Para conseguir una aplicación biomédica, como pretendemos, resulta fundamental controlar su longitud<sup>167,168</sup> obteniendo una distribución normal de longitudes alrededor de los 200 nm. Para obtener esta longitud se procede a la fragmentación de los nanotubos disponibles comercialmente, o bien por métodos oxidativos, ampliamente descritos en la literatura,<sup>98</sup> o bien por métodos mecánicos via ultrasonificación con sonicador de punta.<sup>169</sup> A continuación presento el trabajo realizado con los SWCNTs con los que realicé unos primeros estudios de oxidación, analizando sus propiedades magnéticas y su toxicidad. Seguidamente presentaré el trabajo con los MWCNTs que incluye además de la fragmentación, su funcionalización utilizando como modelo aductos por interacciones  $\pi$ - $\pi$  con aminopireno y posteriormente su funcionalización con agentes de contraste paramagnéticos para MRI, más concretamente complejos de Gd(III).

### 4.2.1. Nanotubos de Carbono de Pared Sencilla (SWCNTs)

#### 4.2.1.1. SWCNTs: Preparación y Caracterización

Se han utilizado SWCNTs comerciales como material de partida (Sigma Aldrich, 0.7-1.2 nm X 2-20  $\mu$ m, obtenidos por CVD), sometiéndolos a distintos tratamientos con el fin de purificarlos y de caracterizarlos adecuadamente. En primer lugar, se han tratado con HCl concentrado, por una parte, para eliminar los residuos metálicos que contienen, derivados de

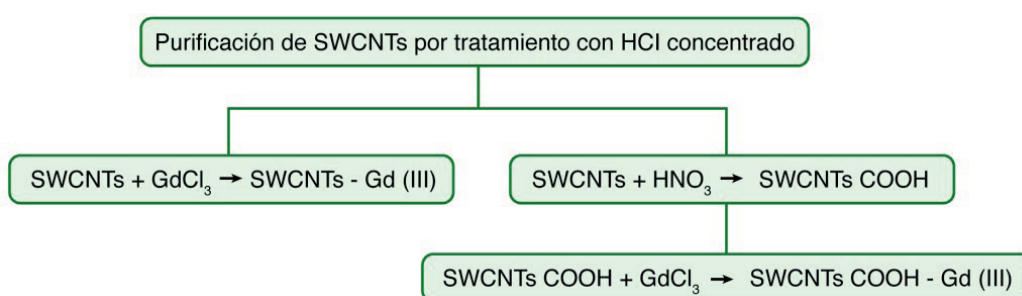
<sup>167</sup> Gu, Z.; Peng, H.; Hauge, R. H.; Smalley, R. E.; Margrave, J. L. Cutting single-wall carbon nanotubes through fluorination. *Nano Letters* **2002**, 2(9), 1009-1013.

<sup>168</sup> Mackeyev, Y. A.; Marks, J. W.; Rosenblum, M. G.; Wilson, L. J. Stable containment of radionuclides on the nanoscale by cut single-wall carbon nanotubes. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109(12), 5482-5484.

<sup>98</sup> Bourlinos, A. B.; Georgakilas, V.; Tzitzios, V.; Boukos, N.; Herrera, R.; Giannelis, E. R. Functionalized carbon nanotubes: Synthesis of meltable and amphiphilic derivatives. *Small* **2006**, 2(10), 1188-1191.

<sup>169</sup> Foillard, S.; Zuber, G.; Doris, E. Polyethylenimine-carbon nanotube nanohybrids for siRNA-mediated gene silencing at cellular level. *Nanoscale* **2011**, 3(4), 1461-1464.

los catalizadores metálicos empleados en su producción y, por otra, para separarlos del carbono amorfo que presentan (**Esquema 4.1**). Además, una muestra de estos SWCNTs se ha oxidado, como ya se ha indicado en el apartado 4.2 de la presente Memoria, obteniéndose SWCNTsCOOH. Ambas muestras se han puesto en contacto con disoluciones acuosas de  $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ <sup>30</sup> y, finalmente, todas ellas se han purificado empleando membranas de diálisis, como se describe en la Parte Experimental de esta Memoria.

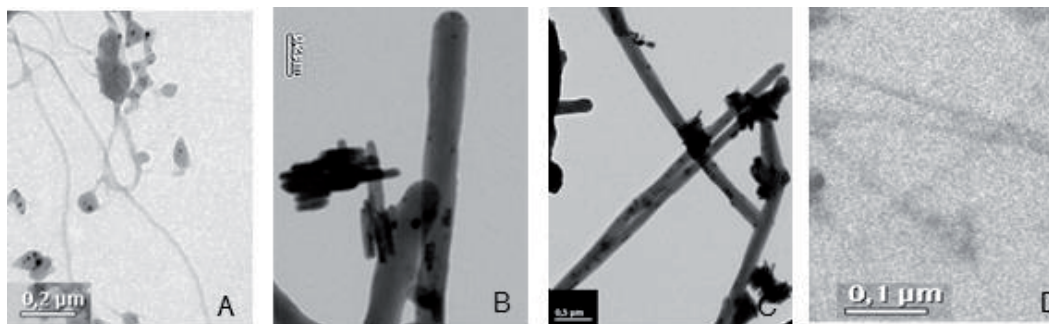


**Esquema 4.1.** Esquema del procedimiento experimental seguido para la purificación y oxidación de SWCNTs

Los SWCNTs así obtenidos se han caracterizado mediante las técnicas habituales empleadas como son Microscopía Electrónica de Transmisión (**Figura 4.16**), Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (**Figura 4.17**), Análisis Termogravimétrico (**Figura 4.18**), Espectroscopia Fotoelectrónica de R-X, (**Figura 4.19**) y Fluorescencia de R-X por Reflexión Total, (**Figura 4.20**).

Las imágenes TEM de SWCNTs comerciales y modificados, obtenidas a 100 kV, presentan características diferentes según los tratamientos empleados.

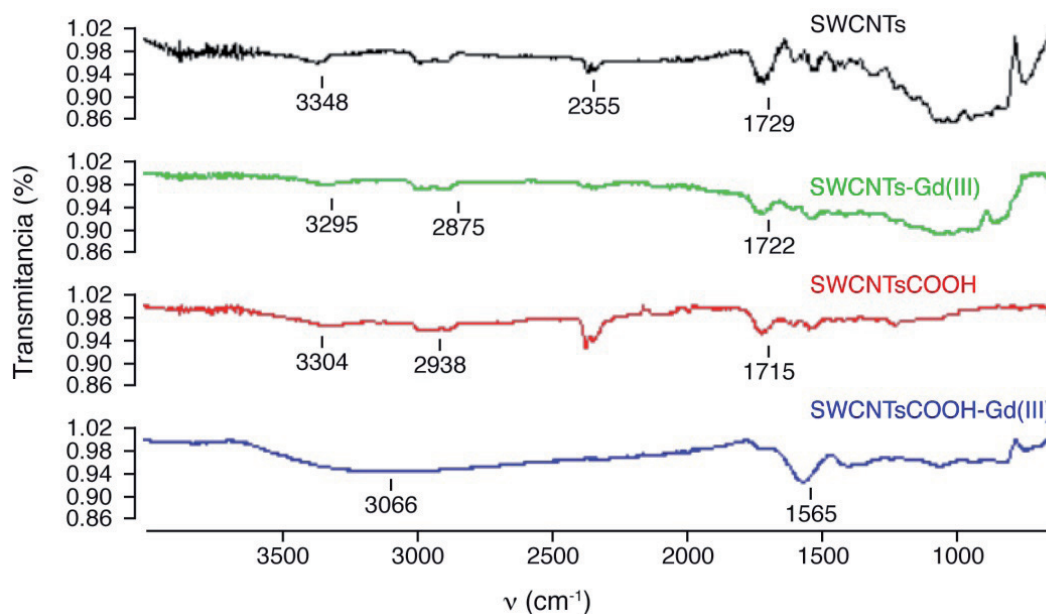
<sup>30</sup> Sitharaman, B.; Kissell, K. R.; Hartman, K. B.; Tran, L. A.; Baikalov, A.; Rusakova, I.; Sun, Y.; Khant, H. A.; Ludtke, S. J.; Chiu, W.; Laus, S.; Toth, E.; Helm, L.; Merbach, A. E.; Wilson, L. J. Superparamagnetic gadonanotubes are high-performance MRI contrast agents. *Chem. Commun.* **2005**, (31), 3915-3917.



**Figura 4.16.** Imágenes representativas TEM, a 100 kV de A) SWCNTs comerciales, B) SWCNTs purificados con HCl conc., C) SWCNTsGd(III) y D) SWCNTsCOOH. La preparación de las muestras se ha realizado por deposición de los SWCNTs, tanto comerciales como modificados, sobre rejillas de cobre y carbono.

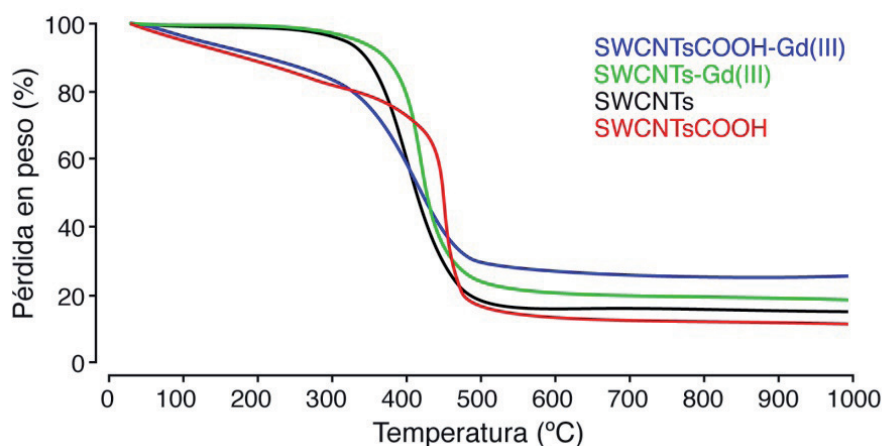
La preparación de SWCNTs comerciales (Figura 4.16A) muestra largos nanohilos ( $>1\mu$ ) entrecruzados, junto con agregados de carbono amorfo o nanopartículas metálicas derivadas de los catalizadores empleados en su preparación. Los SWCNTs tratados con HCl conc. (Figura 4.16 B) aparecen también formando agregados, debido a su gran insolubilidad en medio acuoso, apreciándose también, la presencia significativa de SWCNTs de dimensiones más pequeñas. La Figura 4.16 C, SWCNTs-Gd(III), muestra el aspecto de las preparaciones de SWCNTs-Gd(III), no apreciándose diferencias significativas con respecto a Figura 4.16 B. Por último, Figura 4.16 D muestra el TEM de preparaciones de SWCNTs-COOH. Estos muestran menor tamaño en general y menos dispersión, por la mayor solubilidad que les confieren sus funciones ácidas. Sin embargo, el reducido tamaño y diámetro de los SWCNTsCOOH hacen que la imagen TEM (100kV) no sea demasiado clara, por lo que resultaría necesaria la utilización de equipos de TEM de mayor resolución para la caracterización posterior de éste tipo de muestras.

Los espectros IR (Figura 4.17) presentan la evolución de las cuatro muestras; en particular, en SWCNTsCOOH aparecen bandas a 1715, y 3304  $\text{cm}^{-1}$ , que se asignan a las tensiones C=O y de los OH de los grupos carboxílicos, correspondientes. El desplazamiento de estas bandas a 1565 y 3066  $\text{cm}^{-1}$  en SWCNTsCOOH-Gd(III) sugiere la presencia de carboxilatos de Gd, (Figura 4.17).

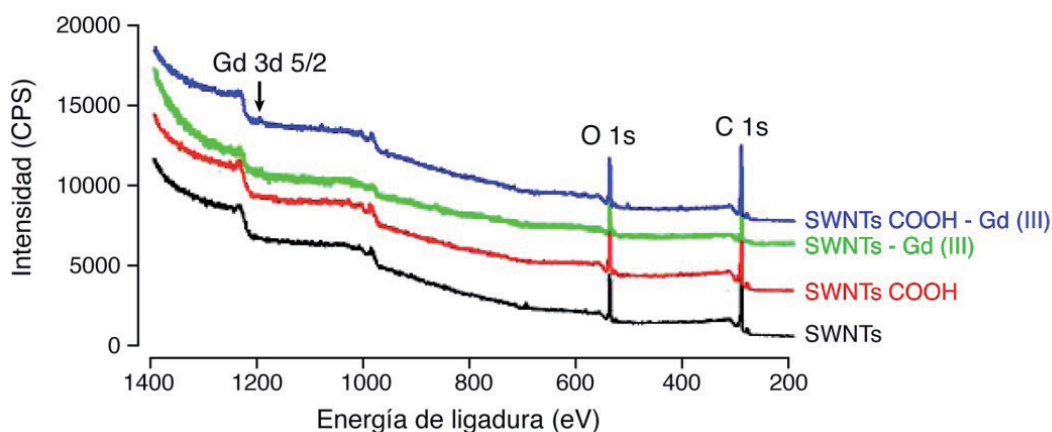


**Figura 4.17.** Espectros infrarrojos (ATR) de A) SWCNTs, B) SWCNTs-Gd(III), C) SWCNTsCOOH y, D) SWCNTsCOOH-Gd(III).

Los perfiles termogravimétricos (Figura 4.18) confirman la presencia de ácidos carboxílicos en las muestras SWCNTsCOOH y SWCNTsCOOH-Gd(III) debido a la pérdida de masa, atribuible a  $\text{CO}_2$ , en el rango de temperaturas entre 200 y 300 °C. La comparación de los residuos resultantes de la calcinación de las cuatro muestras permite determinar, aproximadamente, el contenido en Gd, en forma de  $\text{Gd}_2\text{O}_3$ , que presentan las preparaciones de SWCNTs-Gd(III) y SWCNTsCOOH-Gd(III).

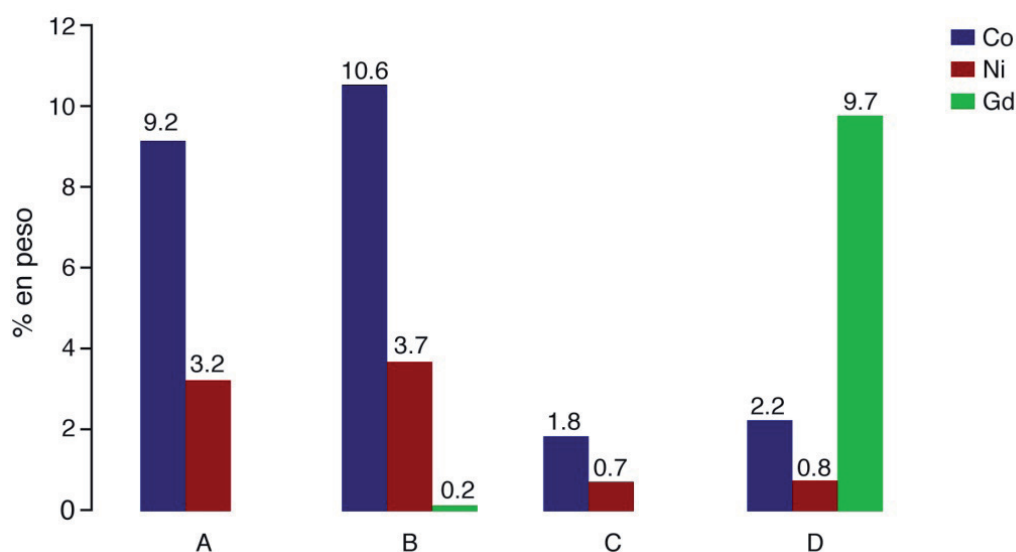


**Figura 4.18.** Perfiles termogravimétricos de SWCNTs, SWCNTs-Gd(III), SWCNTsCOOH y SWCNTsCOOH-Gd(III). El calentamiento se realiza en presencia de aire sintético.



**Figura 4.19.** Perfiles de XPS de SWCNTs, SWCNTsGd(III), SWCNTsCOOH y, finalmente, SWCNTsCOOH-Gd(III). Filamento: Al.

Los experimentos de XPS (Figura 4.19) demuestran la presencia de Gd (pico de Gd 3d<sub>5/2</sub>) en la superficie de los nanotubos oxidados.



**Figura 4.20.** Perfiles de TXRF de preparaciones representativas de A) SWCNTs, B) SWCNTs-Gd(III), C) SWCNTsCOOH y, D) SWCNTsCOOH-Gd(III).

Por otro lado, los experimentos de TXRF proporcionan información cuantitativa del contenido de metales de cada muestra. Los diagramas de barras de la Figura 4.20 muestran que:

a) después del tratamiento inicial con HCl conc. se sigue manteniendo un porcentaje de Co y Ni de 9.18 y 3.22, respectivamente (Figura 4.20 A)



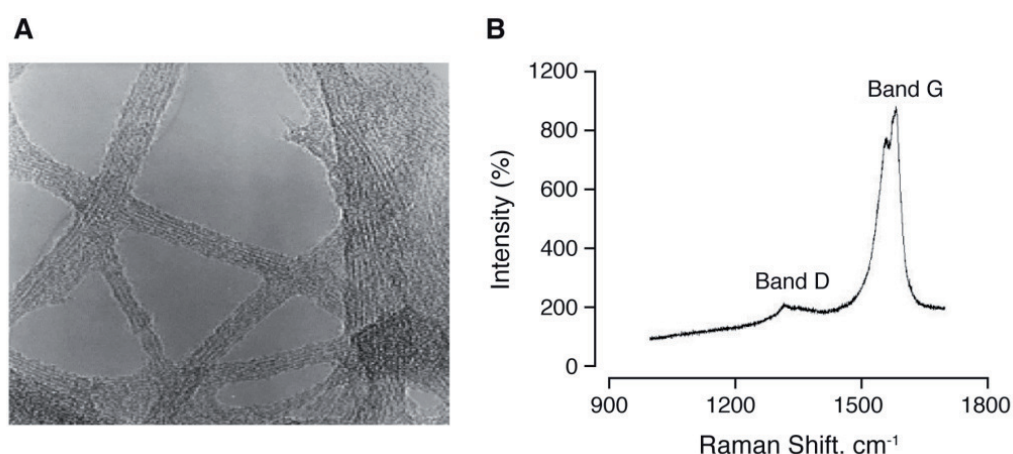
b) en general, los SWCNTs tienen más afinidad por el Co y Ni que por el Gd (Figura 4.20 B)

c) durante el proceso de oxidación, se ha conseguido rebajar, considerablemente, el contenido de Co y Ni (Figura 4.20 C), y por último

d) los SWCNTs oxidados tienen gran afinidad por el ion Gd(III) (Figura 4.20 D).

Posteriormente se ha realizado un estudio sistemático de oxidaciones de SWCNTs comerciales (Sigma-Aldrich, 40-60%, producidos por el método de Descarga de Arco, diámetro inicial 2-10 nm y longitud de 1-5  $\mu\text{m}$ ), en condiciones de ácido nítrico a diferentes tiempos de oxidación: 24, 48, 72 y 96 horas. En los tiempos de 72 y 96 horas se ha observado una significativa descomposición del material y se han descartado para estudios posteriores. De los valores de TXRF se observa una disminución de residuos de catalizadores metálicos que en los comerciales son de Ni (17.6%) e Y (4.33%), mientras que en los oxidados 24 y 48 horas son de 5.10 y 3.35 en Ni y de 0.9 y 0.58 en Y respectivamente.

Las imágenes de Microscopía Electrónica a 300kV, de SWCNTsCOOH (24 horas) muestran claramente la estructura tubular de los nanotubos de carbono, así como la formación de agregados u ovillos (Figura 4.21 A).



**Figura 4.21.** Propiedades fisicoquímicas de SWCNTsCOOH 24 horas. A) Imagen TEM (300 kV), se observa la estructura tubular y la formación de entrecruzamientos. B) Espectro Raman: se confirma la estructura de grafeno en el desdoblamiento de la banda G.



El espectro Raman (Figura 4.21 B) muestra la presencia de la banda de elongación tangencial G con elevada intensidad ( $1550$  y  $1605\text{ cm}^{-1}$ ), que confirma la estructura tipo grafeno.<sup>170,171</sup> Además se observa la presencia de vibraciones a baja intensidad alrededor de  $1320\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$  (banda D), que indican la presencia de defectos, carbono amorfo y pequeños nanotubos como se había observado previamente en la imagen TEM.

La Microscopía de Fuerza Atómica (Figura 4.22 A-C) muestra las variaciones sufridas por los nanotubos tras la oxidación, en particular se observa una disminución de la longitud original de  $1\text{-}5\text{ }\mu\text{m}$  en los comerciales (Figura 4.22 A) a  $200\text{-}700\text{ nm}$  en los de los oxidados durante 48 horas (Figura 4.22 C), así como la disminución de partículas metálicas derivadas de los catalizadores.

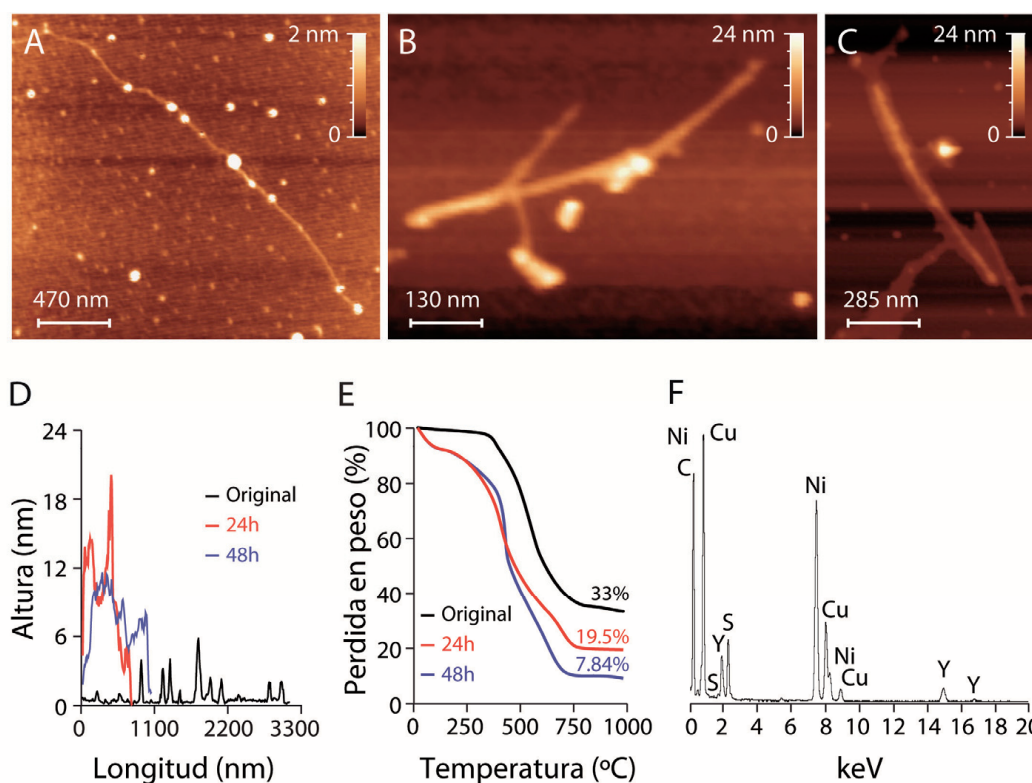
La Figura 4.22 D muestra la relación diámetro/longitud a través de un análisis AFM de los productos de los procesos oxidativos. En particular se observa como al disminuir la longitud, el diámetro aumenta aparentemente, un fenómeno que puede ser debido a plegamientos de los nanotubos o a interacciones laterales entre los mismos. El mayor diámetro podría ser debido, en realidad, al apilamiento de dos o más fragmentos de nanotubos asociados, conteniendo o no partículas de Ni.

El análisis termogravimétrico en aire sintético (Figura 4.22 E) permite comprobar como aumentando el tiempo de oxidación disminuye progresivamente el residuo metálico de los nanotubos de  $33\%$  en los comerciales, a  $19.5\%$  en los oxidados 24 horas y a un  $7.84\%$  en los oxidados durante 48 horas.

---

<sup>170</sup> Lee, W. Y.; Lin, H.; Gu, L.; Leou, K. C.; Tsai, C. H. CVD catalytic growth of single-walled carbon nanotubes with a selective diameter distribution. *Diamond and Related Materials* **2008**, *17*(1), 66-71.

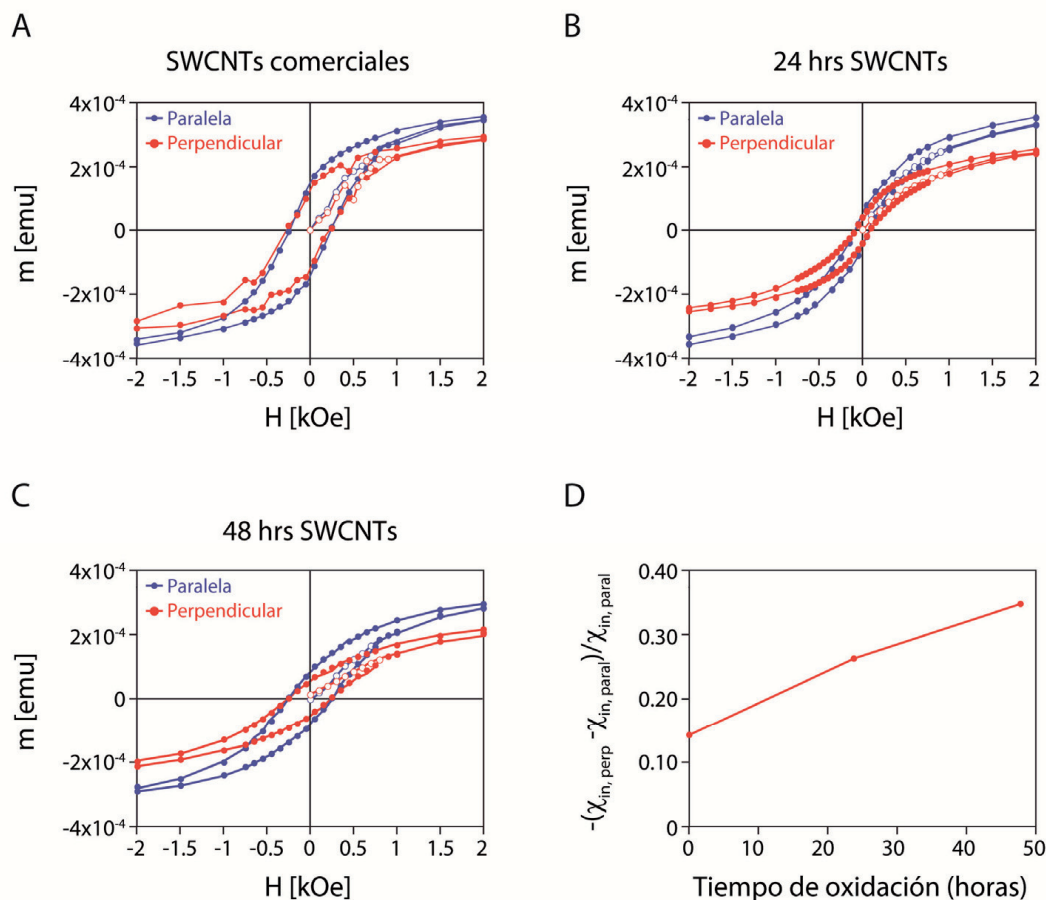
<sup>171</sup> Chen, J.; Hamon, M. A.; Hu, H.; Chen, Y. S.; Rao, A. M.; Eklund, P. C.; Haddon, R. C. Solution properties of single-walled carbon nanotubes. *Science* **1998**, *282* (5386), 95-98.



**Figura 4.22.** Caracterización de SWCNTs comerciales y oxidados durante 24 y 48 horas. Panel superior: Imágenes de AFM de SWCNTs A: comerciales; B: oxidados 24 horas y C: oxidados 48 horas. Panel inferior: D: Relación diámetro/longitud obtenido del análisis del AFM. E: Análisis termogravimétrico en Aire sintético de SWCNTs comerciales, oxidados 24 y 48 horas. F Microanálisis HRTEM-EDAX de SWCNTs oxidados.

El microanálisis EDAX, realizado durante una adquisición TEM desvela la naturaleza de las partículas metálicas (Figura 4.22 F), por otro lado ya determinada por TXRF, como Ni e Y. Los picos correspondientes a carbono pertenecen a los SWCNTs, mientras que el cobre es debido a las rejillas empleadas como soporte para la muestra en el TEM.

Se han estudiado la propiedades magnéticas de preparaciones de SWNCTsCOOH (24 y 48 horas) mediante dispositivos superconductores de interferencia cuántica.



**Figura 4.23.**<sup>172</sup> Ciclos de histéresis (puntos y líneas continuas) y curvas vírgenes (puntos vacíos y líneas con puntos) obtenidos a 5 K de geles de agarosa de A: SWCNTs comerciales, B: oxidados 24 y C: 48 horas. D: variación de la anisotropía magnética con el tiempo de oxidación.

La **Figura 4.23** muestra los ciclos de histéresis y las curvas vírgenes obtenidas mediante SQUID (5 K) en suspensiones de SWCNTs orientadas a  $\theta = 0^\circ$  y  $\theta = 90^\circ$ , con respecto a la dirección del campo magnético estático. Esto se consigue introduciendo las muestras líquidas en el imán, donde se congelan (5 K) orientadas en la dirección del campo magnético estático, midiendo posteriormente los ciclos de histéresis y las curvas vírgenes en la dirección de partida ( $0^\circ$ ) y después de girar la muestra congelada  $90^\circ$ , en el sentido de las agujas del reloj. De estas medidas se

<sup>172</sup> D. Calle Hernández Novel contrast agents for multimodal biomedical imaging based in nanotechnology. Universidad Autónoma de Madrid/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2014.

puede observar claramente la existencia de un momento magnético neto en las muestras y un comportamiento superparamagnético.<sup>173</sup>

Comparando las medidas realizadas con nanotubos orientados paralela (línea y círculos azules) o perpendicularmente (línea y círculos rojos) respecto al campo magnético, se observa que la magnetización detectada es mayor en la dirección paralela en todas las muestras, aunque la magnitud de la magnetización total y la susceptibilidad magnética son diferentes en cada caso. Además analizando las curvas vírgenes (círculos vacíos) se concluye que también la susceptibilidad magnética es mayor en la dirección paralela. Cabe destacar que la magnitud de la anisotropía magnética aumenta desde 0.14 en los comerciales, a 0.26 y 0.35 después de 24 y 48 horas de oxidación, respectivamente. Estos experimentos demuestran que las preparaciones de SWCNTs presentan un magnetismo intrínseco cuya magnitud y dirección dependen de la orientación de la muestra.

#### 4.2.1.2. SWCNTs: Anisotropía Magnética en el Coeficiente de Difusión Aparente<sup>164</sup>

Se han realizado mapas de ADC por Imagen por Resonancia Magnética de una suspensión de SWCNTs oxidados (2mg/ mL) con ácido nítrico durante 24 horas en una suspensión acuosa estabilizada con SBDS (dodecilbencenosulfonato de sodio) al 2% dispuesta en una jeringuilla de polipropileno (Figura 4.24).

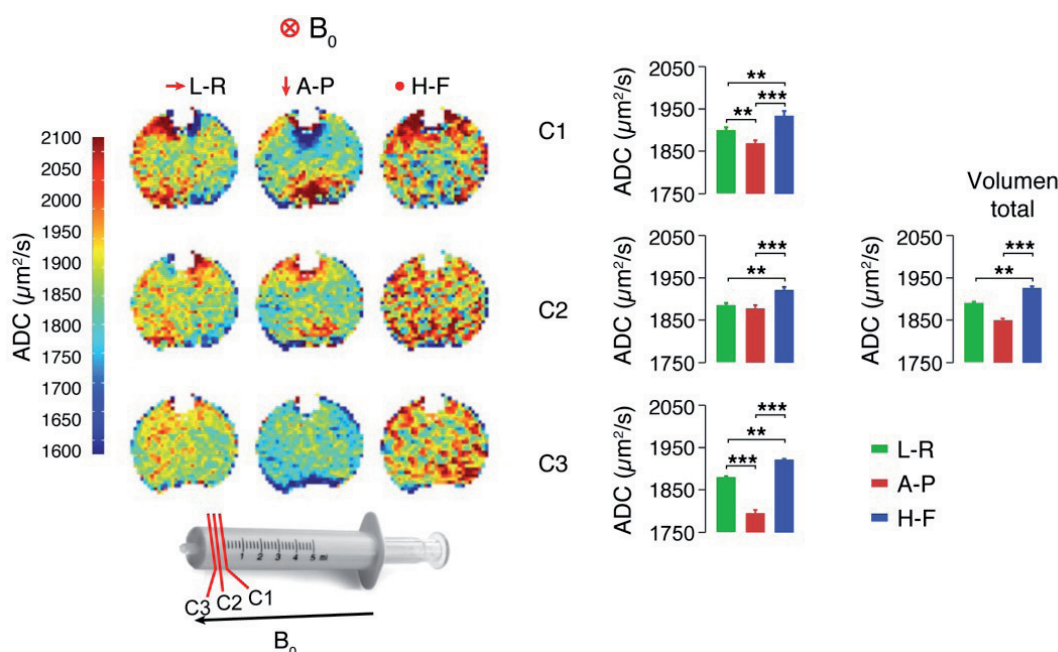
Este experimento se ha realizado para verificar que los nanotubos de carbono en presencia de un campo magnético se alinean induciendo una difusión anisotrópica del medio que los rodea, en este caso el agua.

Los tiempos de relajación de estas suspensiones, medidos a 1.5 Tesla son de 2.0 ( $T_1$ ) y 0.3 ( $T_2$ ) s significativamente inferiores a los del agua (3.5 y

<sup>173</sup> Peng, D. L.; Zhao, X.; Inoue, S.; Ando, Y.; Sumiyama, K. Magnetic properties of Fe clusters adhering to single-wall carbon nanotubes. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *292*, 143-149.

<sup>164</sup> Negri, V.; Cerpa, A.; Lopez-Larrubia, P.; Nieto-Charques, L.; Cerdan, S.; Ballesteros, P. Nanotubular Paramagnetic Probes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging Based on the Diffusion Tensor. *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, *49*(10), 1813-1815.

2.8 s) con una disminución más pronunciada en  $T_2$  que confirma el carácter superparamagnético y justifica el alineamiento de los nanotubos con el campo magnético  $B_0$ .



**Figura 4.24.** Mapas en direcciones ortogonales del ADC del agua en una suspensión de SWCNTsCOOH (24 horas) en tres cortes virtuales sucesivos perpendiculares al campo magnético  $B_0$ .<sup>164</sup>

Los mapas de ADC se han preparado de tres cortes consecutivos (1-3) de una jeringuilla con el gradiente de difusión orientado en tres direcciones ortogonales: head-foot H-F ( $B_0$ ), left-right L-R y antero-posterior A-P en cada corte. El valor promedio de ADC medido en la dirección H-F (paralela a  $B_0$ ), en los tres cortes, resulta significativamente más alto que los obtenidos en los planos perpendiculares, correspondiente a las direcciones L-R y A-P. Esto se puede observar claramente con la mayor proporción de píxeles rojos en el mapa de la dirección H-F en comparación con los mapas de las direcciones A-P o L-R (Figura 4.24 panel izquierdo). Los gráficos de barras confirman este hecho, mostrando en forma de gráfico de barras (panel derecho), la comparación estadística del valor promedio de los

<sup>164</sup> Negri, V.; Cerpa, A.; Lopez-Larrubia, P.; Nieto-Charques, L.; Cerdan, S.; Ballesteros, P. Nanotubular Paramagnetic Probes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging Based on the Diffusion Tensor. *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, 49(10), 1813-1815.

pixeles  $\pm$  sd en las direcciones investigadas, (H-F; azul oscuro, L-R; verde, A-P: rojo) en los tres cortes y en el volumen total. El ADC anisotrópico observado en todos los casos es consistente con el alineamiento de los nanotubos de carbono de la suspensión con el campo magnético como se había previsto, confirmando que las preparaciones de SWCNTs oxidados, inducen una difusión anisotrópica del agua circundante.

#### 4.2.1.3. SWCNTs: Citotoxicidad

Teniendo en cuenta la utilización de los SWCNTs como agentes de contraste para imagen por resonancia magnética, se ha llevado a cabo un estudio piloto de la citotoxicidad de estos sistemas. La Figura 4.25 muestra los resultados de ensayos de MTT (Metil Tiazol Tetrazolio) y LDH (Lactato Deshidrogenasa). El ensayo del MTT mide la competencia mitocondrial para reducir el MTT a formazan, un proceso que ocurre solo en las células vivas por la acción de la succinato deshidrogenasa y puede ser medido espectrofotométricamente.<sup>174</sup> El ensayo LDH mide la liberación de LDH citosólica al medio de incubación, como consecuencia de la rotura de la membrana citoplásmica en las células enfermas o muertas.<sup>175,176</sup> En ambos casos utilizamos cultivos de células C6 de rata y determinamos la viabilidad celular antes de la incubación con suspensiones de SWCNTs (1-1000  $\mu$ g/mL) y después de 1 o 24h de incubación.

El ensayo MTT (Figura 4.25 A y C), muestra aproximadamente un 100% de viabilidad en ausencia de SWCNTs y un descenso en la concentración de formazán dependiente de la concentración de SWCNTs añadidos. Sin embargo, este resultado no refleja realmente un descenso en la viabilidad celular, puesto que se ha descrito que los SWCNTs catalizan

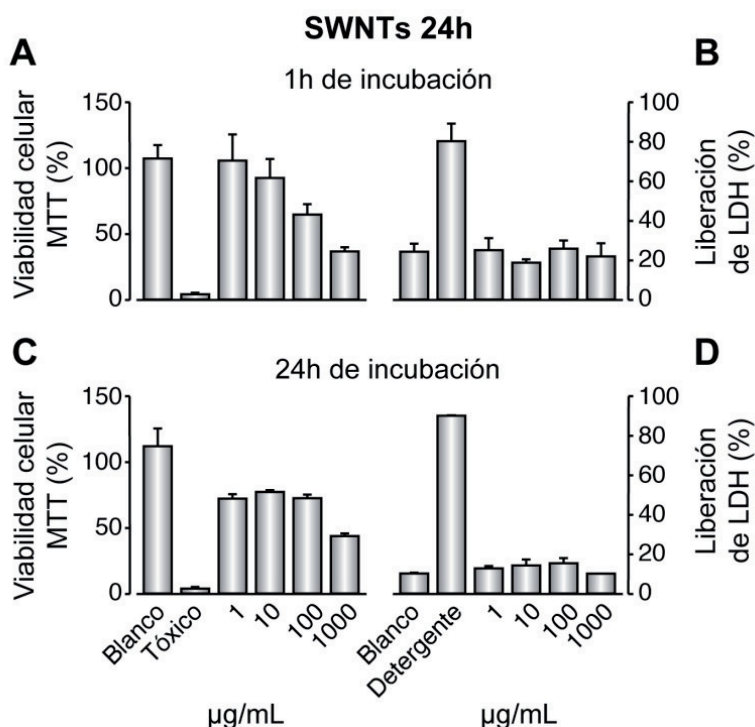
<sup>174</sup> Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65* (1-2), 55-63.

<sup>175</sup> Korzeniewski, C.; Callewaert, D. M. An Enzyme-Release Assay for Natural Cyto-Toxicity. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *64* (3), 313-320.

<sup>176</sup> Decker, T.; Lohmannmatthes, M. L. A Quick and Simple Method for the Quantitation of Lactate-Dehydrogenase Release in Measurements of Cellular Cyto-Toxicity and Tumor Necrosis Factor (Tnf) Activity. *Journal of Immunological Methods* **1988**, *115* (1), 61-69.



espontáneamente la reducción de MTT enmascarando la verdadera supervivencia celular.<sup>177</sup>



**Figura 4.25.** Ensayos MTT (A, C) y LDH (B, D) de citotoxicidad en células C6, incubadas 1h (panel superior) o 24h (panel inferior) con concentraciones crecientes (0-1000 µg/mL) de suspensiones (en suero fetal bovino, FBS) de SWCNTs oxidados con HNO<sub>3</sub> durante 24 horas.

Por esta razón se completaron los estudios de citotoxicidad utilizando el ensayo LDH. (Figura 4.25 B, D). En este caso, no se observa incremento en la liberación de LDH al medio de incubación en el rango 0-1000 µg/mL SWCNTs tanto a 1 como a las 24h, indicando la ausencia de citotoxicidad de estas preparaciones.

<sup>177</sup> Belyanskaya, L.; Manser, P.; Spohn, P.; Bruinink, A.; Wick, P. The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction. *Carbon* **2007**, *45* (13), 2643-2648.

Tomados en conjunto, los resultados de citotoxicidad no revelan efectos tóxicos significativos de las preparaciones SWCNTs en las concentraciones utilizadas para efectos de anisotropía magnética mediante MRI o SQUID.

En resumen se han obtenido y caracterizado diferentes preparaciones de SWCNTs oxidados que demuestran, por primera vez, una difusión anisotrópica del agua en mapas de ADC. Se han estudiado las propiedades magnéticas de estas preparaciones midiendo los ciclos de histéresis por SQUID y se han encontrado diferencias entre las orientaciones paralelas y perpendiculares al campo magnético aplicado, sugiriendo un magnetismo anisotrópico intrínseco en las preparaciones de SWCNTs. Los estudios de citotoxicidad no revelan efectos tóxicos significativos a las concentraciones estudiadas.

#### 4.2.2. Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple (MWCNTs)

Las dificultades encontradas en la caracterización TEM y la acusada tendencia de los nanotubos de pared sencilla a agregarse originando ovillos y suspensiones heterogéneas inestables, hizo recomendable cambiar el modelo a nanotubos de carbono multicapa que permiten una manipulación más eficiente.

##### 4.2.2.1. MWCNTs: Preparación y caracterización

Se han llevado a cabo dos fragmentaciones diferentes de MWCNTs comerciales: métodos oxidativos en condiciones sulfonítricas<sup>99</sup> y fragmentación por ultrasonificación con sonicador de punta.<sup>169</sup>

Se han escogido dos métodos diferentes para poder comparar la efectividad de la fragmentación en relación al acortamiento de longitud de los nanotubos y a la disminución de las impurezas metálicas.

El primer caso,<sup>99</sup> utiliza el corte de los nanotubos por oxidación en condiciones sulfonítricas, mezcla 3:1 de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98% y HNO<sub>3</sub> al 60%, en

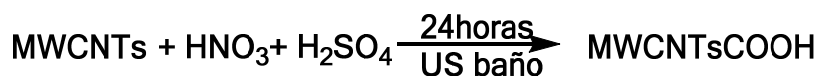
---

<sup>99</sup> Samori, C.; Sainz, R.; Menard-Moyon, C.; Toma, F. M.; Venturelli, E.; Singh, P.; Ballestri, M.; Prato, M.; Bianco, A. Potentiometric titration as a straightforward method to assess the number of functional groups on shortened carbon nanotubes. *Carbon* **2010**, *48* (9), 2447-2454.

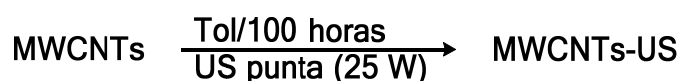
<sup>169</sup> Foillard, S.; Zuber, G.; Doris, E. Polyethylenimine-carbon nanotube nanohybrids for siRNA-mediated gene silencing at cellular level. *Nanoscale* **2011**, *3* (4), 1461-1464.



baño de ultrasonidos a temperatura ambiente durante 24 horas, originando MWCNTsCOOH.



El segundo,<sup>169</sup> emplea ultrasonificación con sonicador de punta durante 100 horas en tolueno con una potencia de salida de 25W. Este método tiene la ventaja de que emplea condiciones más suaves, ya que no se usan ácidos fuertes.



En ambos casos, tras el proceso de fragmentación, se filtran los nanotubos sobre membranas Omnipore<sup>®</sup> (0.45 μm) se lavan repetidas veces con H<sub>2</sub>O Milli-Q y se secan en un desecador con manta calefactora a 60 °C y pentóxido de fósforo. Estas preparaciones se han caracterizado empleando las siguientes técnicas: TEM, FT-IR con ATR de Germanio y de Diamante, TGA, TGA-MS (Análisis termogravimétrico acoplado a masa), XPS y TXRF.

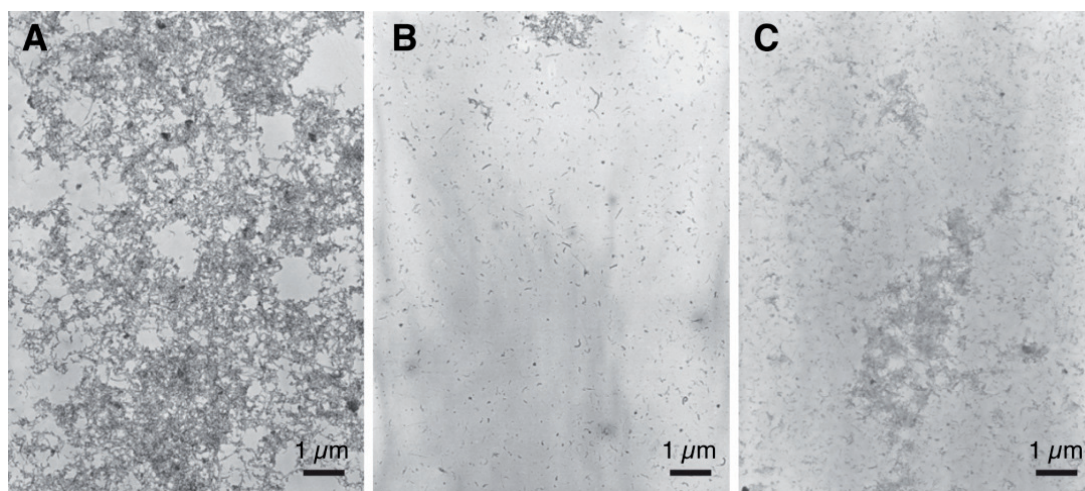
### Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las imágenes TEM se obtuvieron rutinariamente utilizando un microscopio electrónico de transmisión operando a 200kV, como se indica en la Parte Experimental. Una vez fijadas las muestras sobre rejillas de cobre se obtuvieron las micrografías, realizando un análisis estadístico del tamaño de los nanotubos midiendo manualmente cada nanotubo con el programa Image J<sup>178</sup> y obteniendo posteriormente los histogramas relativos de distribución de longitudes relativas. La Figura 4.26 muestra algunos resultados representativos.

<sup>169</sup> Foillard, S.; Zuber, G.; Doris, E. Polyethylenimine-carbon nanotube nanohybrids for siRNA-mediated gene silencing at cellular level. *Nanoscale* **2011**, 3(4), 1461-1464.

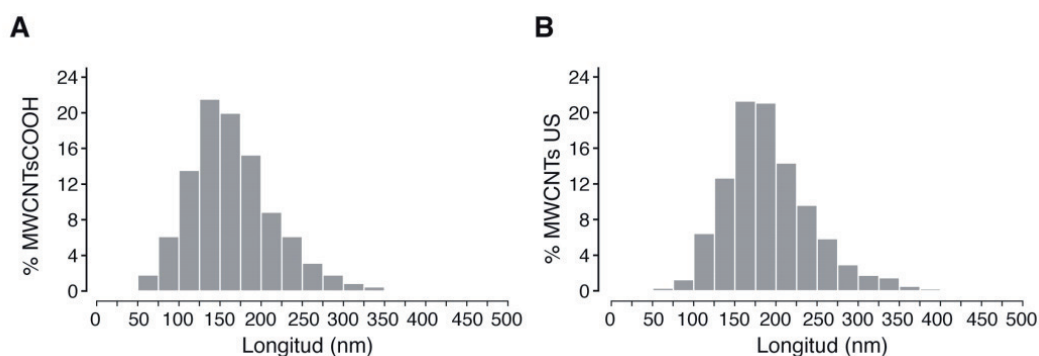
<sup>178</sup> Rasband, W.S. Image J, U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.

Las imágenes TEM de los MWCNTs fragmentados tanto por oxidación (Figura 4.26 B) como por ultrasonicación (Figura 4.26 C) muestran mayor desagregación y menor entrecruzamiento que los ovillos observados en nanotubos comerciales (Figura 4.26 A). Además los MWCNTs fragmentados presentan una disminución apreciable de su longitud, como muestran los histogramas de distribución de longitudes (Figura 4.27).



**Figura 4.26.** Imágenes TEM (200 kV) de A: MWCNTs comerciales, B: MWCNTs oxidados en condiciones sulfonítricas y C: MWCNTs fragmentados con sonicador de punta.

Los histogramas de distribución de longitudes (Figura 4.27 A y B) muestran como con ambos métodos de fragmentación se obtiene una longitud comparable. Más concretamente, el 91% de los nanotubos oxidados muestra una longitud comprendida entre 75 y 250 nm, mientras que el 90% de los fragmentados por ultrasonido presentan una longitud entre 100 y 275 nm.



**Figura 4.27.** Histogramas de distribución de longitudes de A: MWCNTs oxidados y B: MWCNTs fragmentados por ultrasonidos.

### Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (TXRF)

Comparando los resultados de TXRF de la **Tabla 4.10** se observa como el contenido metálico es inferior al 1% en los nanotubos comerciales y disminuye considerablemente con el proceso oxidativo y en menor medida en la fragmentación por ultrasonidos.

**Tabla 4.10.** Resultados TXRF de nanotubos comerciales, oxidados y fragmentados por ultrasonidos.

	Fe%	Co%	Ni%
MWCNTs	0.159	0.612	0.014
MWCNTsCOOH	0.031	0.183	0.007
MWCNTsUS	0.071	0.270	0.007

### Análisis Termogravimétrico (TGA)

Como ya se ha descrito en la literatura<sup>99</sup> los análisis termogravimétricos TGA en Argón y TGA-MS muestran una elevada pureza del producto comercial ya que no se produce una pérdida en peso considerable a los 900 °C (**Figura 4.28**). Asimismo el TGA en aire confirma la pureza del material teniendo un residuo de tan solo el 4.35%, con una pérdida del 95.68% (533.5 °C) debida solamente a los nanotubos (**Figura 4.29**). Los MWCNTsCOOH en Ar muestran una mayor pérdida con respecto a las otras dos muestras, debida a la presencia de grupos carboxílicos (**Figura 4.28**). En aire, se observan dos pérdidas: una de 10.3% entre 90 y 350 °C de, atribuible a CO<sub>2</sub> y otra entre 400 y 600 °C<sup>179</sup> (601.4 °C), que origina un residuo de 3.14% debida a la oxidación de los nanotubos (**Figura 4.29**). Los MWCNTs US, debido a la escasa presencia de grupos carboxilato, muestran menor pérdida con respecto a los nanotubos oxidados hasta 350 °C, siendo el residuo en Ar de 91.5% (**Figura 4.28**). Sin embargo en aire se

<sup>99</sup> Samori, C.; Sainz, R.; Menard-Moyon, C.; Toma, F. M.; Venturelli, E.; Singh, P.; Ballestri, M.; Prato, M.; Bianco, A. Potentiometric titration as a straightforward method to assess the number of functional groups on shortened carbon nanotubes. *Carbon* **2010**, *48*(9), 2447-2454.

<sup>179</sup> Lehman, J. H.; Terrones, M.; Mansfield, E.; Hurst, K. E.; Meunier, V. Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes. *Carbon* **2011**, *49*(8), 2581-2602.

observa una pérdida del 91.75% debida a la oxidación de los MWCNTs a 549.3 °C y un residuo a 980 °C de 5.3%.(Figura 4.29).

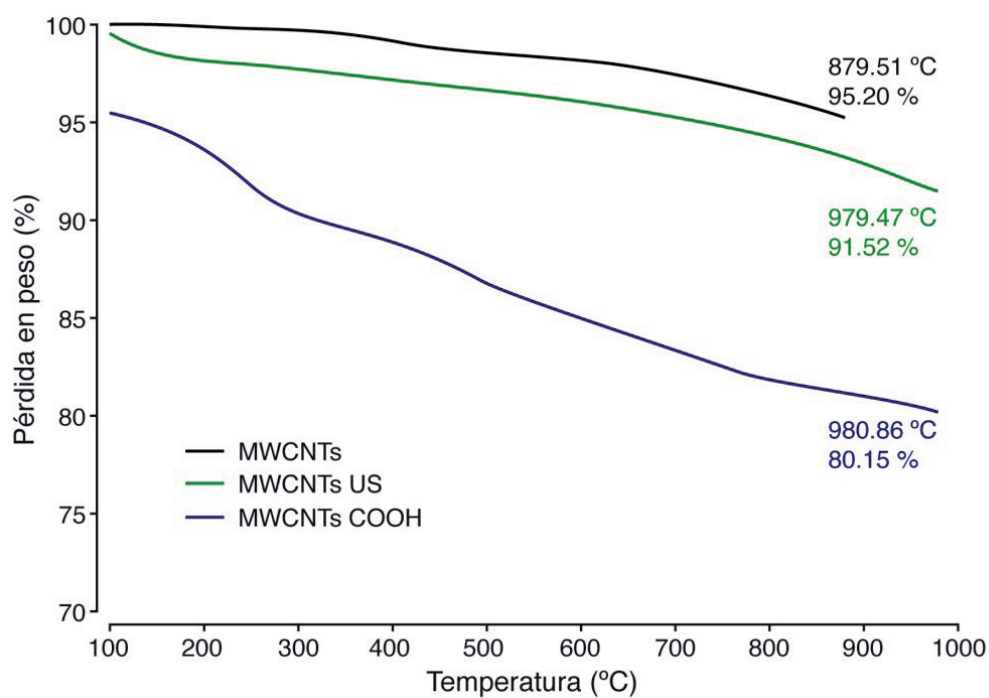


Figura 4.28. TGA en Argón de MWCNTs, MWCNTS US y MWCNTsCOOH

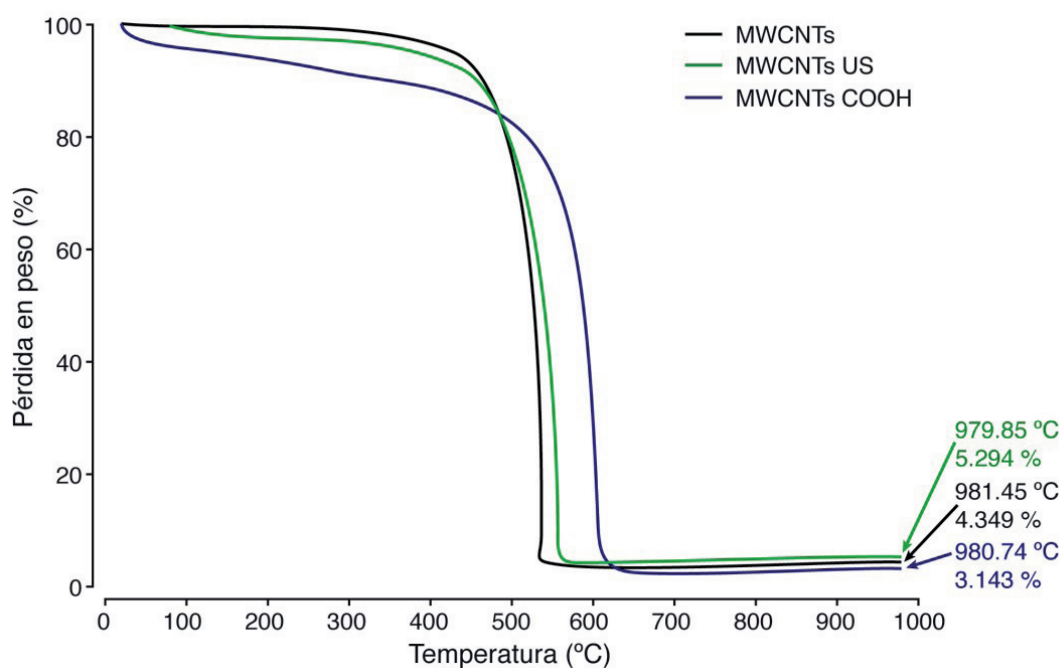
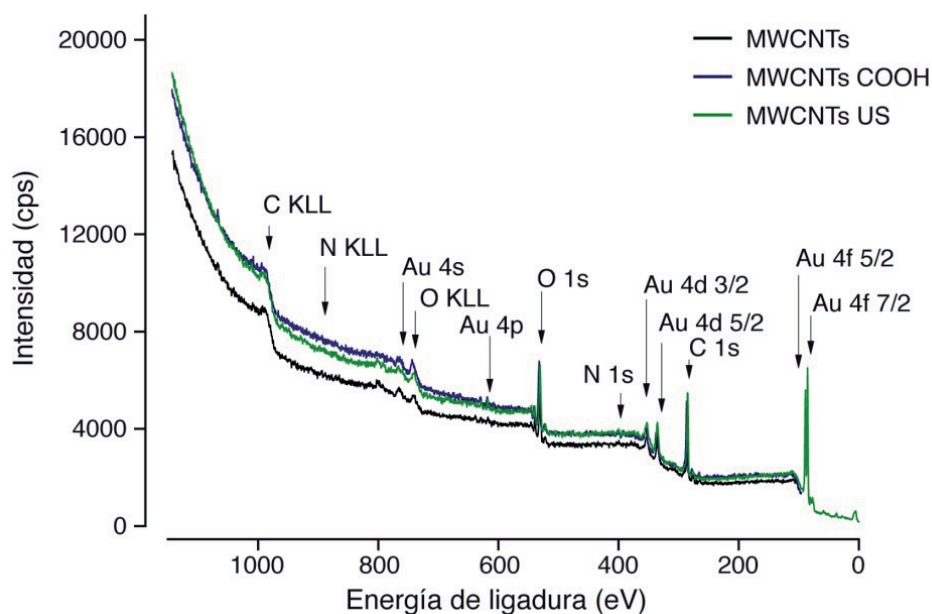


Figura 4.29. TGA en Aire de MWCNTs, MWCNTS US y MWCNTsCOOH

En los espectros XPS (Figura 4.30.) se observan los elementos presentes en las superficies de las muestras analizadas.



**Figura 4.30.** Espectros XPS de MWCNTs, MWCNTsCOOH y MWCNTsUS

La **Tabla 4.11** recoge además de los elementos presentes, el área de cada elemento y la concentración relativa: cabe destacar como aumenta la concentración de oxígeno en el caso de los MWCNTsCOOH por la presencia de los grupos carboxílicos.

**Tabla 4.11.** Datos relativos a las especies encontradas en las muestras MWCNTs, MWCNTsCOOH y MWCNTs US.

	Especie	Posición	R.S.F	Area	% Atómico
MWCNTs	C 1s	284.6	1	11914.5	77.58
MWCNTsCOOH	C 1s	284.4	1	9509.2	73.58
MWCNTs US	C 1s	284.5	1	11460.8	75.97
MWCNTs	O 1s	530	2.85	9178.7	20.7
MWCNTsCOOH	O 1s	530	2.85	9179.3	24.92
MWCNTs US	O 1s	530.4	2.85	9552.2	22.92
MWCNTs	N 1s	400.4	1.77	292.6	1.08
MWCNTsCOOH	N 1s	399.5	1.77	237.2	1.04
MWCNTs US	N 1s	399.4	1.77	354.7	1.33

Este efecto es todavía más claro considerando la relación de intensidades oxígeno/carbono en las diferentes muestras (Tabla 4.12). Existe un incremento del 0.07% (O/C MWCNTsCOOH - O/C MWCNTs) en la muestra oxidada con respecto a la comercial.

**Tabla 4.12.** Relación O/C en MWCNTs, MWCNTsCOOH, MWCNTs US

	MWCNTs	MWCNTsCOOH	MWCNTs US
Relación O/C	0.270	0.339	0.292

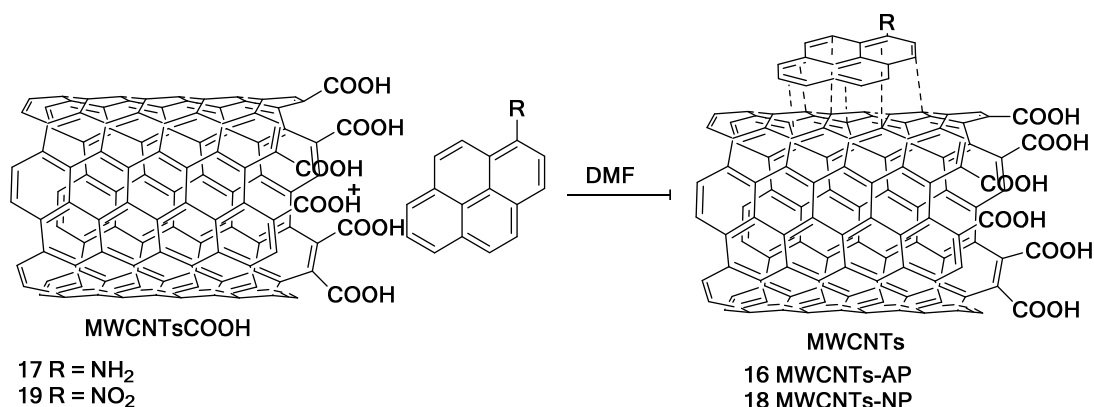
Se han obtenido MWCNTs fragmentados tanto por métodos oxidativos en condiciones sulfonítricas como por sonicación con sonicador de punta. El análisis de las imágenes TEM ha proporcionado la distribución de longitudes de estas preparaciones: ambas muestran una distribución normal y los MWCNTsCOOH son ligeramente más cortos (entre 50 y 300 nm, con un máximo alrededor de 130 nm) que los MWCNTsUS (entre 100 y 350 nm, con un máximo alrededor de 180 nm). El TXRF muestra como los MWCNTsCOOH tienen menos partículas metálicas que los MWCNTsUS, y esto se observa también con los TGA ya que los MWCNTsUS tienen un mayor residuo a 980 °C. El XPS muestra mayor presencia de oxígeno en los MWCNTsCOOH, como cabía esperar por las condiciones oxidativas que introducen grupos carboxilos en las extremidades del nanotubo.

### 4.3. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ADUCTOS POR INTERACCIONES $\pi-\pi$ ENTRE CNTs, AMINO (AP) Y NITRO PIRENO (NP)

#### 4.3.1. Formación aductos

Se ha sintetizado y caracterizado un aducto (16) por interacciones  $\pi-\pi$ , entre nanotubo de carbono oxidado y amino pireno (AP, 17), como aducto patrón para poder estudiar sus propiedades magneto-ópticas y de fluorescencia. También se ha sintetizado un aducto (18) entre nitropireno (NP, 19) y nanotubo de carbono oxidado para comparar la influencia entre un grupo funcional atractor y uno donador de electrones, (Esquema Sintético 1).



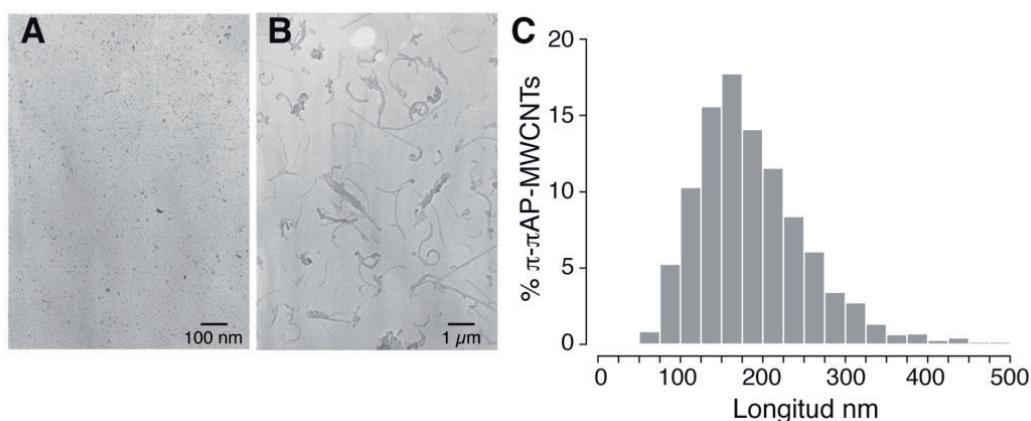


**Esquema Sintético 1.** Formación de aductos entre AP, NP y MWCNTs.

### 4.3.2. Caracterización físico-química de los aductos

#### Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las imágenes TEM del aducto AP-MWCNTs (16) (A y B) muestran como la presencia del amino pireno y la consecuente formación del aducto, favorecen la ruptura de las interacciones electrostáticas entre los nanotubos.



**Figura 4.31** A: imagen TEM (200 kV) de aducto AP-MWCNTs (16). B: Imagen TEM de aducto AP-MWCNTs. C: histograma distribución de longitudes obtenido de A.

Analizando el histograma de distribución de longitudes (Figura 4.31 C) obtenido del panel de la Figura 4.31 A, se observa como no hay una variación significativa en la longitud de los nanotubos durante la formación del aducto con respecto a los nanotubos oxidados (Figura 4.27 A).

### Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF)

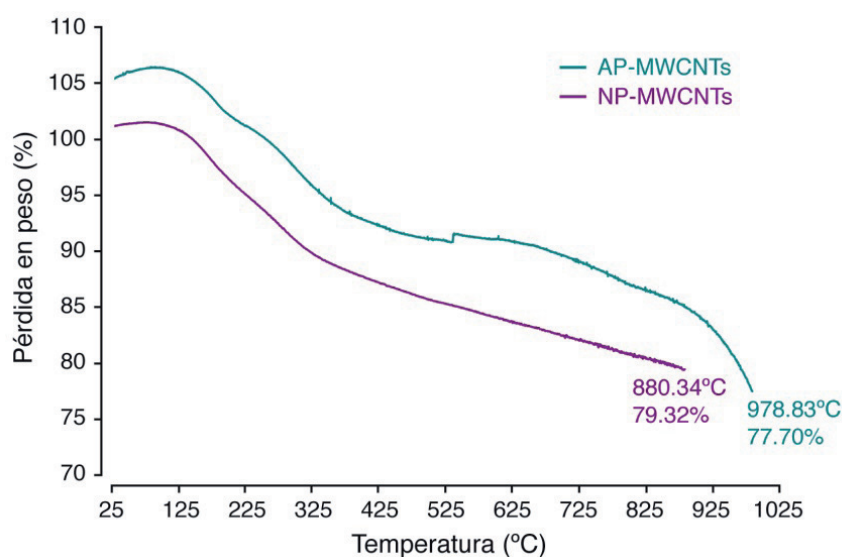
El análisis TXRF de los dos aductos muestra como hay un contenido comparable en metales, con la muestra de nanotubos oxidados.

**Tabla 4.13.** Análisis TXRF de los aductos con AP y NP

Aducto	Fe	Co	Ni
AP-MWCNTs	0.046	0.322	0.005
NP-MWCNTs	0.141	0.343	0.012

### Análisis Termogravimétrico (TGA)

Los TGA en Argón de los dos aductos reflejan una funcionalización de los nanotubos ya que se observa una pérdida en peso de 15% para AP-MWCNTs y 14% para NP-MWCNTs a partir de alrededor de 100 °C hasta alcanzar los 400 °C, **Figura 4.32**.



**Figura 4.32.** TGA en Ar de AP-MWCNTs y NP-MWCNTs

Analizando las curvas TGA en aire se confirma la funcionalización con los derivados de pireno, observándose una pérdida en peso de 9.6% debida al amino pireno entre 220 y 400 °C, y una posterior alrededor de 600 °C atribuible a los nanotubos, obteniéndose un residuo final de 5.7%.

En el caso del derivado de NP, también se observa pérdida en peso hasta 342 °C de 9.1% asignable a la funcionalización con nitropireno, y una



pérdida alrededor de 500 °C debido a los nanotubos, originando un residuo a 570 °C de 17.9%, (Figura 4.33).

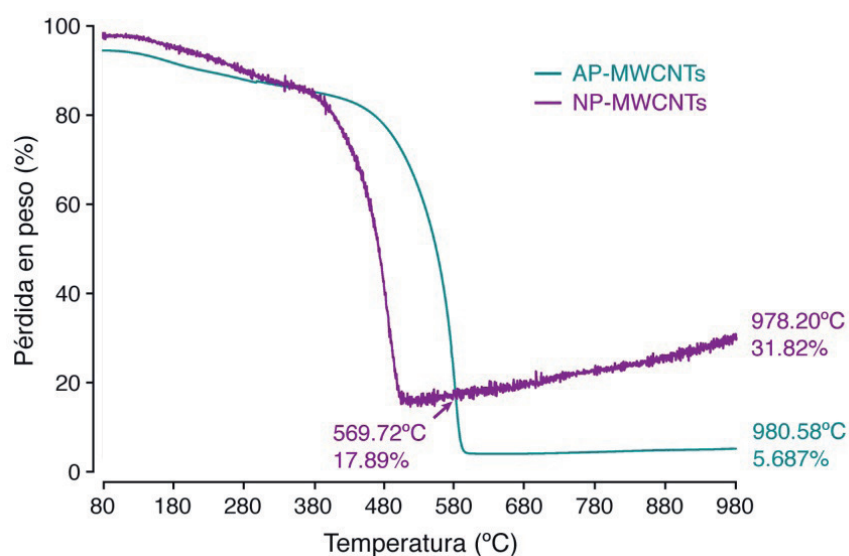


Figura 4.33. TGA en Aire de AP-MWCNTs y NP-MWCNTs.

### Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

Del XPS del aducto AP-MWCNTs se pueden observar las especies presentes en la superficie de la muestra. (Figura 4.34).

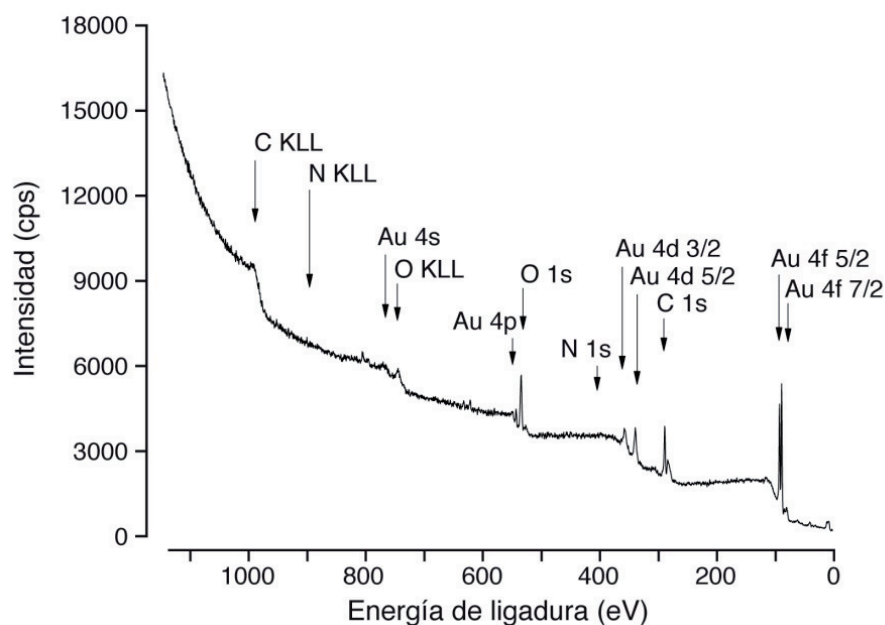


Figura 4.34. Espectro XPS del aducto AP-MWCNTs

En la **Tabla 4.14** se reflejan además de los elementos presentes, el área de cada elemento y la concentración relativa, donde cabe destacar un aumento significativo en el % atómico de nitrógeno debido a la funcionalización con aminopireno en comparación con los MWCNTsCOOH.

**Tabla 4.14.** Análisis XPS de las especies encontradas en el aducto AP-MWCNTs

Especie <sup>a)</sup>	Posición <sup>b)</sup>	R,S,F <sup>c)</sup>	Área <sup>d)</sup>	% Atómico <sup>e)</sup>
C 1s	284.5	1	5741.6	66.18
O 1s	529.5	2.85	6718.7	27.17
N 1s	397.6	1.77	937.8	6.11

<sup>a)</sup> En la especie se indica el orbital observado en cada elemento encontrado, <sup>b)</sup> los números indican la energía de enlace encontrada para cada especie en eV, <sup>c)</sup> R, S, F, se refieren a los valores relativos de referencia empleados, <sup>d)</sup> el área es el valor de la integral de la banda observada, <sup>e)</sup> los números indican la composición atómica relativa de la muestra.

Se constata un aumento en la relación N/C con respecto a la muestra de MWCNTsCOOH, tal y como se refleja en la tabla siguiente.

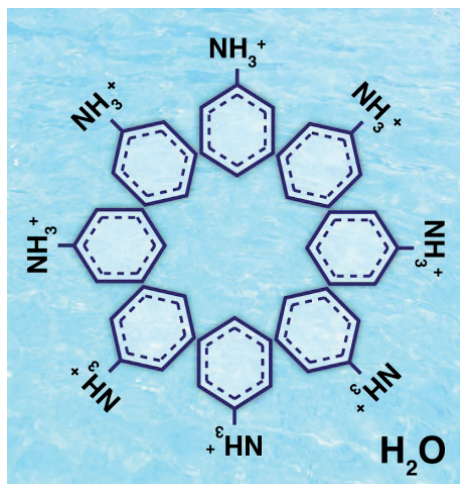
**Tabla 4.15.** Relación O/C y N/C en MWCNTs, MWCNTsCOOH y aducto AP-MWCNTs oxidados

	MWCNTs	MWCNTsCOOH	AP-MWCNTs
O/C	0.27	0.339	0.411
N/C	0.014	0.14	0.092

#### 4.3.2.2. Espectros de emisión de fluorescencia de aminopireno (AP) a diferentes pH y del aducto AP-MWCNTs.

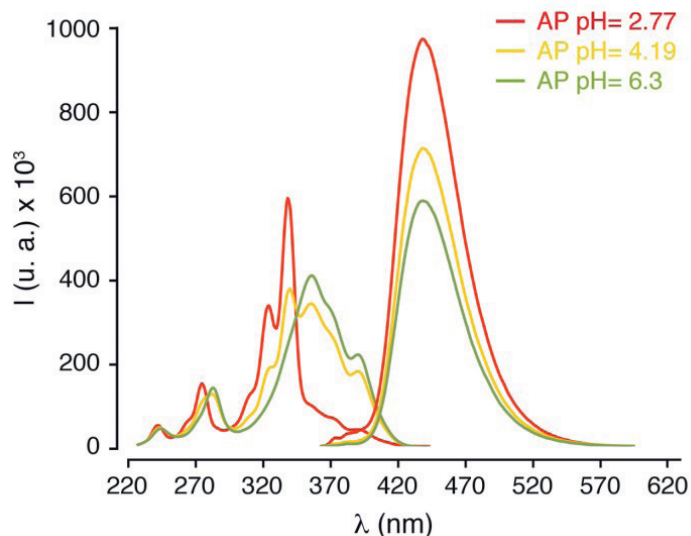
Comenzamos por estudiar la fluorescencia de aminopireno en agua. El aminopireno ha revelado ser bastante insoluble en agua y ha sido necesario añadir un 30% (v/v) de metanol para favorecer su entrada en disolución. El fenómeno observado a pH ácidos, es la formación de micelas esféricas: se piensa que los grupos amino protonados, se orientan hacia fuera mientras los grupos pireno se agrupan en el interior de la micela. (Figura 4.35).

El uso del sonicador de punta (15 °C, 10% potencia de salida durante 10 minutos) durante el proceso de disolución hace que las micelas se produzcan de manera estable.



**Figura 4.35.** Formación de micelas de aminopireno en disolución acuosa a pH ácido.

Para su caracterización espectrofotométrica y espectrofluorimétrica se añade metanol para disgregar las micelas y observar moléculas de 1-AP individuales. Más concretamente los espectros obtenidos para las disoluciones acuosas de 1-aminopireno presentan concentraciones  $[1\text{-AP}] = 1,8 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  y  $\text{MeOH} < 1 \%$ . Se registran en tampón cítrico-fosfato a 20 °C a pHs de 2.77, 4.19 y 6.3, respectivamente. En los espectros de excitación la  $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$  y en los de emisión  $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ .



**Figura 4.36.** Espectro de absorción ( $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$ ) y de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{\text{emi}} = 340 \text{ nm}$ ) de AP en disoluciones acuosas a pH 2.77, 4.19 y 6.3.

El 1-AP es un sistema donde los estados excitados muestran una fuerte interacción entre el sistema  $\pi$ - $\pi^*$  y el grupo  $n$ - $\pi^*$ . El bloqueo del grupo amino mediante la formación de complejos con un protón dando 1-APH<sup>+</sup> conduce a un complejo que exhibe propiedades fotofísicas similares a las de pireno, mientras que el sistema no protonado exhibe las propiedades fotofísicas características de aminopireno.<sup>180</sup> Los espectros de absorción varían con el pH. La constante de equilibrio de disociación protónica del estado fundamental ( $pK_a$ ) es de 2.8 y para el estado excitado la  $pK_a^*$  es de 1.2<sup>181</sup> así que en este intervalo de pHs existe un equilibrio entre la especie neutra (AP) y protonada (APH<sup>+</sup>). A pH = 2.77 se observan máximos a 322 y 338 nm; mientras que a pH = 4.19 los máximos se desplazan a 339, 359 y 391 nm. Esto es así porque a pH > 4, en el estado excitado, prevalecen las formas disociadas y no se observa la especie protonada APH<sup>+</sup>.<sup>182</sup> Como se observa en la Figura 4.36 el espectro obtenido a pH = 4.19 muestra un

<sup>180</sup> Hite, P.; Krasnansky, R.; Thomas, J. K. Spectroscopic Investigations of Surfaces Using Aminopyrene. *Journal of Physical Chemistry* **1986**, *90* (22), 5795-5799.

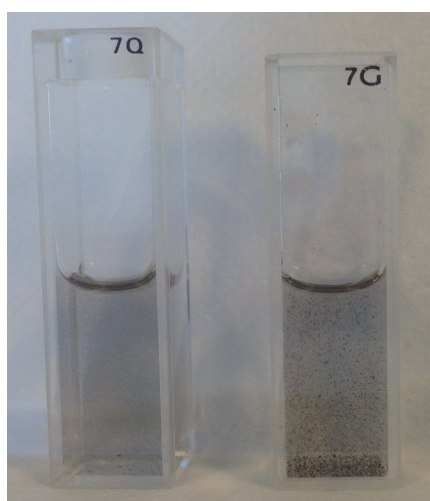
<sup>181</sup> Shizuka, H.; Tsutsumi, K.; Takeuchi, H.; Tanaka, I. Direct Measurement of Proton Dissociation in the Excited-State of Protonated 1-Aminopyrene with Picosecond Pulses. *Chemical Physics Letters* **1979**, *62* (2), 408-412.

<sup>182</sup> Miller, E.; Wysocki, S.; Jozwik, D. Fluorescence studies of the sol-gel transition using aminopyrene. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry* **2005**, *169* (3), 221-228.

comportamiento intermedio entre el espectro a pH = 2.77 y el de 6.33. En particular, el espectro obtenido a pH = 4.19 conserva el pico a 339 nm, mientras que los picos observados a 359 y 391 nm son más característicos de pHs más elevados: concretamente a pH = 6.3 los máximos están a 356 y 392 nm.

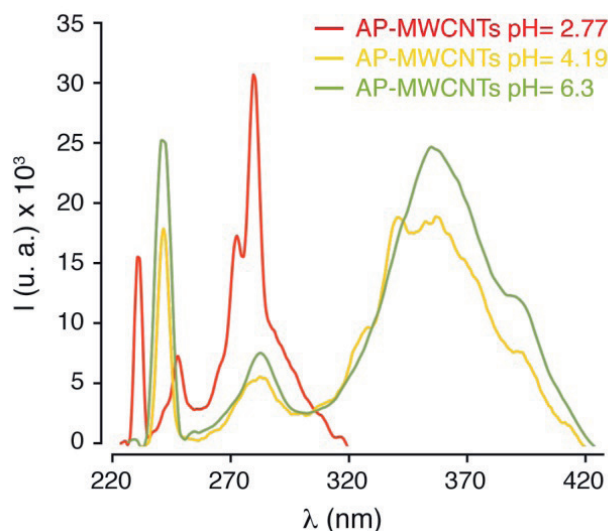
En los espectros de emisión no se observa un pico estructurado,<sup>180</sup> característico de la emisión del aminopireno en disolventes apolares, sino un pico ancho, que se atribuye claramente a la emisión del excímero a 440 nm, cuya intensidad disminuye al aumentar del pH.

Seguidamente estudiamos las propiedades espectrofluorimétricas (20 °C,  $10^{-6}$  mg/mL) de una suspensión homogénea del aducto AP-MWCNTs en tampón cítrico-fosfato, a los mismos pHs utilizados con anterioridad: 2.77, 4.19 y 6.3. La solubilidad del aducto en agua disminuye al aumentar del pH, como muestra la Figura 4.37.



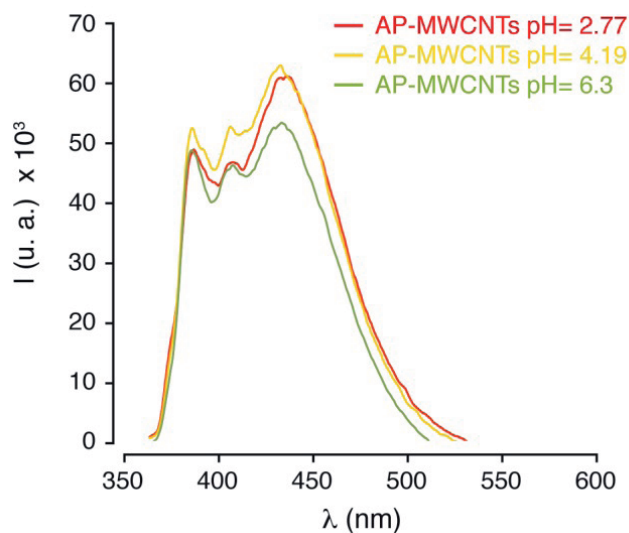
**Figura 4.37.** Cubeta 7Q: suspensión de AP-MWCNTs a pH = 2.77; Cubeta 7G suspensión de AP-MWCNTs a pH = 4.19.

<sup>180</sup> Hite, P.; Krasnansky, R.; Thomas, J. K. Spectroscopic Investigations of Surfaces Using Aminopyrene. *Journal of Physical Chemistry* **1986**, 90 (22), 5795-5799.



**Figura 4.38.** Espectro de absorción ( $\lambda_{\text{exc}} = 480$  nm) del aducto AP-MWCNTs en disoluciones acuosas a pHs 2.77, 4.19 y 6.3.

Los espectros de absorción a diferentes pH, presentan las mismas bandas que los espectros de 1-AP. En el caso de la disolución a pH = 2.77 los picos son a 242, 275, 324 y 340 nm, mientras que para las disoluciones a pH = 4.19 y pH = 6.3 los picos más intensos se observan a 356 y 411 nm (Figura 4.38).



**Figura 4.39.** Espectro de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{\text{emi}} = 340$  nm) del aducto AP-MWCNTs en disoluciones acuosas a pHs 2.77, 4.19 y 6.3.

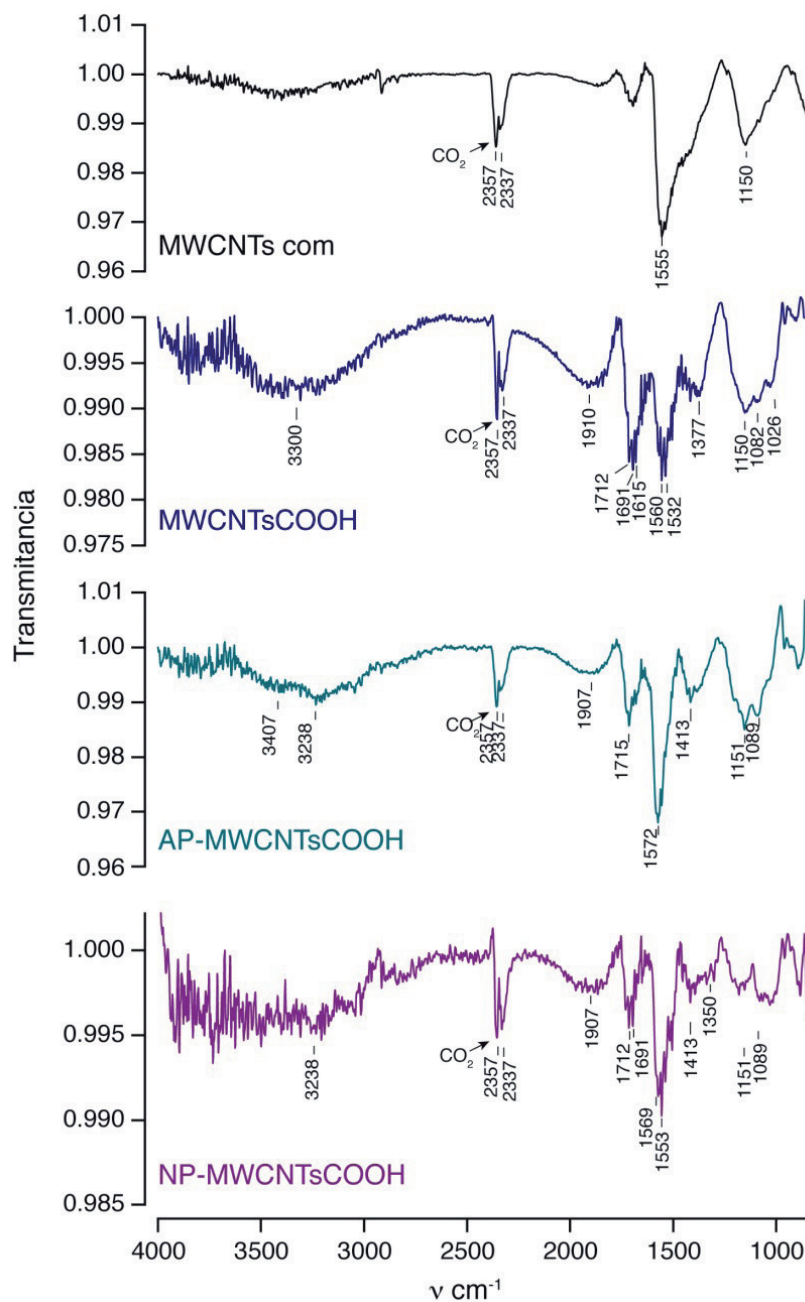
Los espectros de emisión del aducto, se diferencian con respecto a los del 1-AP, en que están más resueltos y presentan tres picos a 385, 405 y 425 nm, con mayor intensidad en la muestra con pH más ácido (Figura 4.39). La presencia de estos tres picos parece indicar que la presencia de los nanotubos no favorece la formación del excímero gracias a las interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre la superficie del nanotubo y el anillo pirénico.

#### 4.3.2.3. Espectroscopia Infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR con ATR)

Los espectros infrarrojos muestran una evolución en las muestras, Figura 4.40. Los nanotubos comerciales (en negro) muestran la banda más intensa a  $1555\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a  $\nu\text{ C}=\text{C}$  del esqueleto del nanotubo, mientras que desde  $1200\text{ cm}^{-1}$  hasta  $800\text{ cm}^{-1}$  se observa la huella dactilar de los MWCNTs, característica de todas las muestras. En los nanotubos oxidados (en azul) se observan las siguientes bandas:  $3300\text{ cm}^{-1}$  de la tensión O-H, a  $1712\text{ cm}^{-1}$  de tensión C=O,  $1560\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión C=C del esqueleto del nanotubo y a  $1377\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión C-O.

En el espectro de AP-MWCNTs (verde) aparece, además de los picos presentes en los nanotubos oxidados, una banda ancha a  $3400\text{ cm}^{-1}$  debida a la tensión NH que se solapa a la tensión O-H de los carboxílicos.





**Figura 4.40.** Espectros FTIR de MWCNTs, MWCNTsCOOH, aducto AP-MWCNTs y aducto MWCNTsCOOH-NP.

El espectro FT-IR del aducto NP-MWCNTs (en púrpura) muestra, además de las bandas presentes en los nanotubos oxidados, una banda a  $1553 \text{ cm}^{-1}$  de la tensión asimétrica N=O que se solapa a C=C del esqueleto de los nanotubos y otra a  $1350 \text{ cm}^{-1}$  de la tensión N=O simétrica.



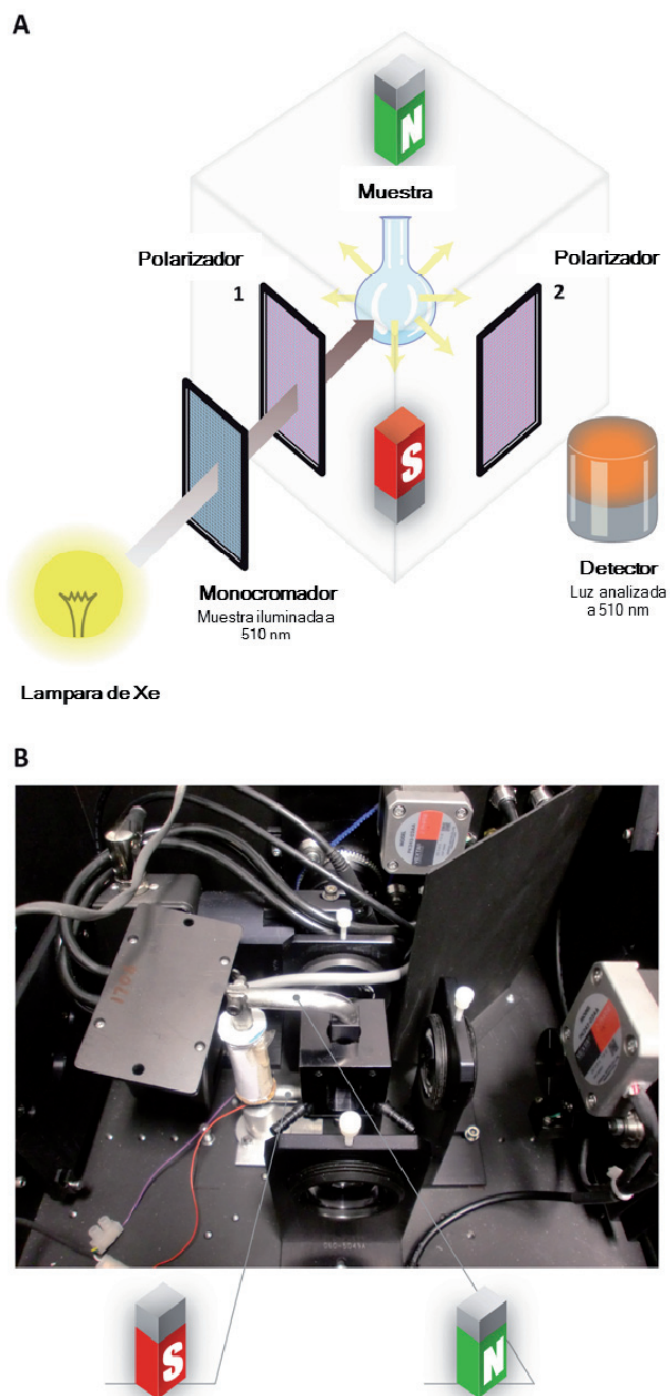
#### 4.3.2.4. MWCNTs: Propiedades magneto-ópticas<sup>172</sup>

Se ha investigado el alineamiento magnético y la anisotropía del aducto AP-MWCNTs, mediante técnicas magneto-ópticas. En primer lugar se ha diseñado un experimento de dispersión de luz en presencia, o no, de un campo magnético externo. Brevemente se preparó una disolución estable de AP-MWCNTs en dimetilformamida (DMF 0.25 mg/mL), depositándola en una microcubeta de cuarzo. La cubeta se colocó en un espectrofluorímetro iluminándola con luz polarizada (510 nm) y recogiendo la luz dispersada en dirección perpendicular a la dirección de iluminación, empleando polarizadores cruzados (Figura 4.41 A y B).

Se construyó un pequeño electroimán adaptable al fluorímetro, con sus dos polos en el fondo y la superficie de la microcubeta, de forma tal que se pudiera inducir un campo magnético continuo o transitorio, a través de la disolución de nanotubos, dejando libre el camino óptico de excitación y detección (Figura 4.41 B). Se realizó entonces el experimento de dispersión de la luz, apagando (off) o encendiendo (on) el campo magnético, y detectando la luz dispersada en ambas situaciones.

---

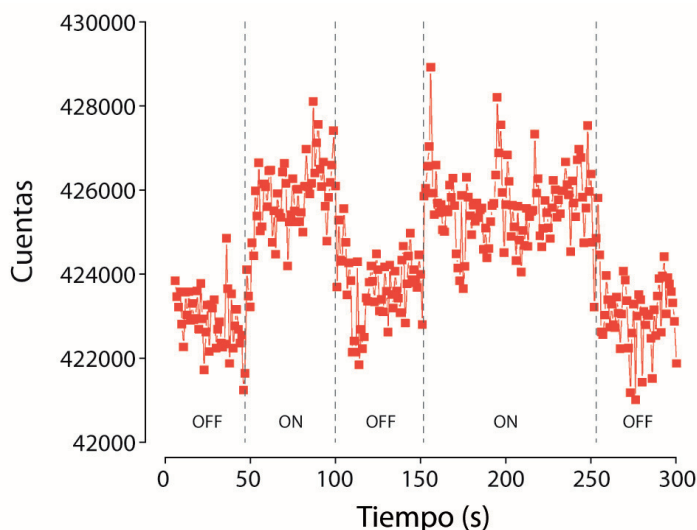
<sup>172</sup> D.Calle Hernández Novel contrast agents for multimodal biomedical imaging based in nanotechnology. Universidad Autónoma de Madrid/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2014



**Figura 4.41.** Montaje del experimento de dispersión magneto-óptica en soluciones de AP-MWCNTs, sobre un espectrofluorímetro comercial.

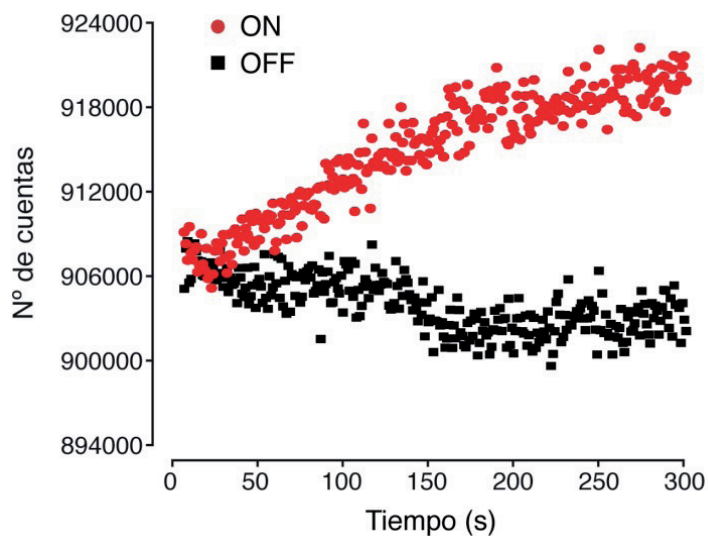
La Figura 4.42 muestra los resultados de conectar y desconectar el campo magnético, sobre la dispersión de luz. La presencia del campo magnético produce un aumento significativo de la dispersión de luz, sugiriendo una

orientación de los nanotubos en el campo aplicado, mientras que su ausencia resulta en una disminución de la dispersión, muy posiblemente causada por una desorientación de la muestra.

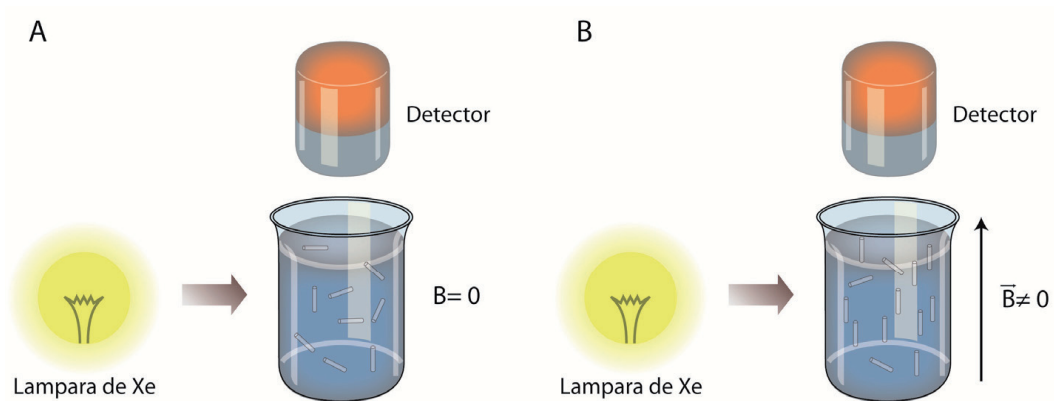


**Figura 4.42.** Cuentas de fotones de luz dispersada por soluciones de AP-MWCNTs expuestas (ON) o no (OFF) a un campo magnético.

Realizamos además otro experimento de dispersión de luz con el mismo equipo y disposición, pero manteniendo encendido el campo magnético continuamente durante cinco minutos (Figura 4.43). En este caso, las cuentas detectadas aumentaron con el tiempo, sugiriendo que la orientación de los nanotubos en solución no es inmediata y que el número de nanotubos orientados paralelamente al campo aumenta progresivamente con el tiempo de exposición. Tomados en conjunto, los resultados de dispersión magneto-óptica de luz, indican una orientación transitoria o continua de los nanotubos en la dirección del campo magnético aplicado, que se puede detectar mediante un aumento en la luz dispersada.



**Figura 4.43.** Cuentas de fotones de luz dispersada en presencia (rojo) y ausencia (negro) de un campo magnético aplicado continuamente durante cinco minutos.



**Figura 4.44.** Dispersión de la luz en el espectrofluorímetro: cuando el campo magnético está encendido los nanotubos se orientan de forma paralela al campo dispersando más fotones hacia el detector que cuando el campo magnético está apagado.

Este diseño permite llevar a cabo también medidas de anisotropía en la dispersión, variando la orientación del polarizador de detección relativamente a la del analizador (Figura 4.44). Este proceso de orientación relativa se realiza automáticamente, mediante el software del aparato.

El espectrofluorímetro calcula la anisotropía mediante la Ecuación 4.2:

$$A = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot G \cdot I_{VH}} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

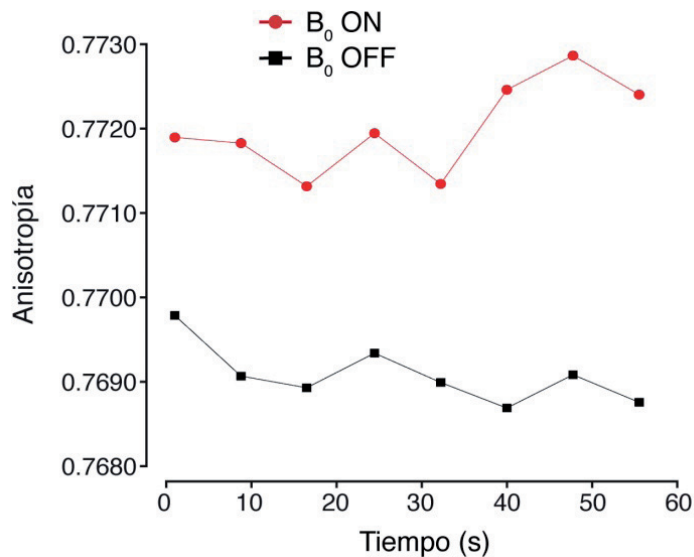
donde  $I_{VV}$  es la intensidad de la luz cuando los polarizadores están colocados en posición vertical,  $I_{VH}$  con el analizador colocado en vertical y el polarizador horizontal y  $G$  es un factor de corrección según la Ecuación 4.3:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

donde  $I_{HV}$  es la intensidad de la luz cuando el analizador de la lámpara está orientado horizontalmente y el polarizador verticalmente; y  $I_{HH}$  cuando los dos están orientados horizontalmente.

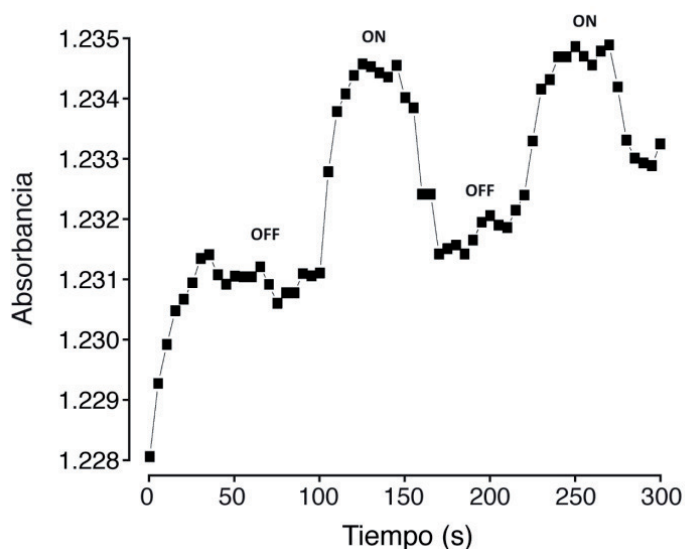
En estas condiciones determinamos la anisotropía de soluciones de AP-MWCNTs en presencia y en ausencia de campo magnético continuamente aplicado, o no, durante 1 min (Figura 4.45)

Cuándo se aplica el campo magnético la muestra resulta más anisotrópica, sugiriendo una estructura de la suspensión más anisotrópica con los nanotubos orientados paralelamente al campo magnético.



**Figura 4.45.** Valores de anisotropía de dispersión de luz en presencia y ausencia de un campo magnético externo aplicado continuamente durante 60 s.

Realizamos un experimento similar de evaluación de la anisotropía en la absorción óptica empleando soluciones de AP-MWCNTs en DMF empleando un espectrofotómetro dotado de analizador y polarizador. El espectro de absorción de pireno mostró un máximo a 340 nm.<sup>183</sup> La muestra se ilumina posteriormente con luz polarizada a 340 nm. Cuando el campo magnético está encendido y los nanotubos están en posición paralela a la luz polarizada, la absorbancia de la muestra aumenta hasta que se apaga el campo magnético (Figura 4.46).

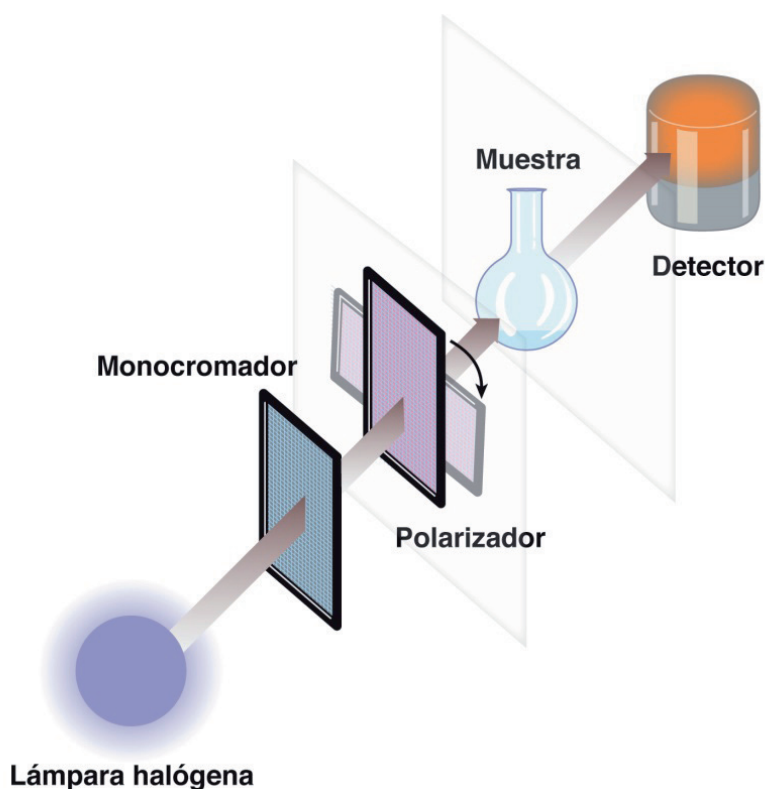


**Figura 4.46.** Absorbancia (340 nm) vs tiempo de suspensión de AP-MWCNTs en DMF en presencia (ON) y ausencia (OFF) de campo magnético.

El paso siguiente está constituido por la fijación de los MWCNTs con una dirección conocida sobre una matriz sólida que impida su movimiento browniano y permita medir sus propiedades ópticas en diferentes direcciones. Con este propósito utilizamos un gel de agarosa. Brevemente, se preparó una solución de agarosa 0,5% (w/v) en estado líquido (60 °C) en la que resuspendió la preparación de MWCNTs. Para orientar los nanotubos, se colocó la suspensión de agarosa en el isocentro de un imán de 7T, permitiendo descender la temperatura hasta temperatura ambiente. Estas condiciones, los MWCNTs se orientan en la dirección del campo

<sup>183</sup> Saeva, F. D. Optical-Properties of Anisotropically Ordered Solutes in Cholesteric Liquid-Crystalline Mesophases. *Pure and Applied Chemistry* **1974**, 38 (1-2), 25-36.

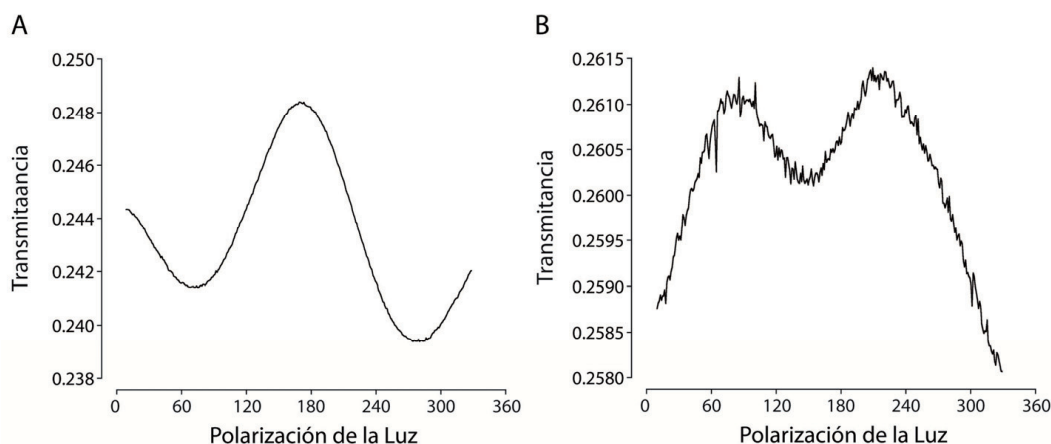
magnético y quedan atrapados en la estructura de la agarosa solidificada. Dado que la preparación es translúcida, se cortaron rodajas de 1mm de agarosa cargada de MWCNTs y se fijó sobre el soporte del espectrofotómetro de luz polarizada, midiendo la variación de transmitancia al girar el polarizador (Figura 4.47).



**Figura 4.47.** Montaje del experimento de transmitancia variando el plano de polarización de luz de soluciones de AP-MWCNTs, en un espectrofotómetro comercial.

La **Figura 4.48** muestra la variación de transmitancia con la muestra orientada en dos posiciones ortogonales, con los MWCNTs perpendiculares (**Figura 4.48 A**) o paralelos (**Figura 4.48 B**), al plano inicial de la luz polarizada. La transmitancia de la luz es máxima cuando el plano de polarización de luz es perpendicular a los nanotubos, desciende a un mínimo (**Figura 4.48 A**) cuando el plano de polarización es paralelo (rotando el polarizador  $90^\circ$ ) y alcanza un nuevo máximo cuando el plano de polarización es de nuevo perpendicular al eje de los nanotubos (rotando el polarizador  $180^\circ$ ). Estas variaciones indican que la absorción de luz polarizada es máxima cuando el

plano de polarización y el eje principal de los nanotubos son paralelos. Cuando el gel de garosa cargado de nanotubos se gira  $90^\circ$ , el perfil de transmitancia es, como cabría esperar, la imagen especular del anterior (Figura 4.48 B). El ruido en las dos medidas es diferente por la diferente orientación e inclinación del gel de agarosa durante la medida espectrofotométrica.



**Figura 4.48.** Transmitancia a 340 nm de una suspensión de AP-MWCNTs fijada en un gel de agarosa para diferentes orientaciones del plano de polarización de la luz. A: Polarización inicial perpendicular al eje principal de los AP-MWCNTs. B: Polarización inicial paralela al eje principal de AP-MWCNTs.

Este comportamiento es debido a la adsorción de tipo  $\pi$ - $\pi$  del pireno adsorbido sobre la pared del nanotubo, lo que confiere al aducto diferentes propiedades de absorbancia óptica en función de su orientación.<sup>183</sup> De acuerdo con la bibliografía, y con nuestros resultados de modelización molecular (Sección 4.1.1.1), el pireno se acopla paralelamente al eje principal del nanotubo originando un máximo de absorción a 340 nm.<sup>184</sup>

Nuestros resultados muestran como la anisotropía magnética y óptica son propiedades macromoleculares que se conservan en estos materiales, también a temperatura ambiente. En este sentido, la anisotropía magneto-óptica se añade a la gran colección de excepcionales propiedades de los

<sup>183</sup> Saeva, F. D. Optical-Properties of Anisotropically Ordered Solutes in Cholesteric Liquid-Crystalline Mesophases. *Pure and Applied Chemistry* **1974**, *38* (1-2), 25-36.

<sup>184</sup> Leyton, P.; Gomez-Jeria, J. S.; Sanchez-Cortes, S.; Domingo, C.; Campos-Vallette, M. Carbon nanotube bundles as molecular assemblies for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons: Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy and theoretical studies. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (13), 6470-6474.



nanotubos de carbono tales conductancia eléctrica, capacidad térmica o elasticidad. Este aspecto resulta de especial relevancia en el caso de los agentes de contraste para Imagen por Resonancia Magnética ya que los quelatos de Gd(III) más empleados muestran propiedades de relajación isotrópicas. Efectivamente, las barreras de energía libre para la reorientación molecular de los quelatos de Gd(III) son muy bajas e inferiores a la barrera térmica  $kT$ , lo que origina reorientaciones promedio de momento magnético isotrópicas a temperatura ambiente.<sup>3</sup>

El comportamiento de estructuras nanométricas tubulares es diferente y las barreras de energía requeridas para la reorientación térmica a temperatura ambiente son suficientemente grandes para impedir la reorientación del nanotubo a temperatura ambiente, proporcionando así la base termodinámica para el fenómeno de la alineación.

Se considera que este es un hallazgo especialmente relevante, ya que puede permitir la determinación no invasiva de la orientación molecular de los nanotubos en tres dimensiones, a partir de medidas del comportamiento de difusión del agua como se obtiene del tensor de difusión por MRI.<sup>164</sup> Esto podría permitir detectar de forma no invasiva e *in vivo* las orientaciones tridimensionales de los ensamblajes de las moléculas, trayectorias micro vasculares y agregados celulares marcándolos selectivamente con SWCNTs o MWCNTs.

Por otro lado, los avances en la generación de preparación solubles de nanotubos merecen algún comentario adicional. Las preparaciones previas de SWCNTs y MWCNTs eran altamente insolubles en agua y por eso inutilizables en aplicaciones de química médica y en el desarrollo de agentes de contraste.<sup>76,94,185-190</sup>

<sup>3</sup> Walker, M. M.; Diebel, C. E.; Haugh, C. V.; Pankhurst, P. M.; Montgomery, J. C.; Green, C. R. Structure and function of the vertebrate magnetic sense. *Nature* **1997**, *390* (6658), 371-376.

<sup>164</sup> Negri, V.; Cerpa, A.; Lopez-Larrubia, P.; Nieto-Charques, L.; Cerdan, S.; Ballesteros, P. Nanotubular Paramagnetic Probes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging Based on the Diffusion Tensor. *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, *49* (10), 1813-1815.

<sup>76</sup> Iijima, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature* **1991**, *354* (6348), 56-58.

<sup>94</sup> O' Connel, M. J. Carbon nanotubes: properties and applications. **2006**. CRC press.

En las secciones anteriores se ha mostrado como los MWCNTs pueden ser solubilizados en agua después de la fragmentación, bien por vía oxidativa o bien por ultrasonidos y de la funcionalización con derivados de pireno formando aductos por interacciones  $\pi-\pi$ . Las preparaciones obtenidas se mantienen estables, al menos, durante algunos meses.

En resumen, los resultados de las medidas magneto-ópticas y de SQUID abren nuevas perspectivas para el empleo de nanotubos de carbono como agentes de contraste direccionales en MRI, como sondas capaces de determinar la orientación en tres dimensiones de conjuntos moleculares *in vivo* y, potencialmente, para combinar en la misma nanoplataforma, agentes de imagen y moléculas terapéuticas. En los siguientes apartados se describe la síntesis y la obtención de estos potenciales agentes de contraste.

---

<sup>185</sup> Jorio, A.; Dresselhaus, G.; Dresselhaus, M. S. Carbon Nanotubes: advanced topics in the synthesis, structure, properties and applications. **2008**. Springer.

<sup>186</sup> Ebbesen, T. W.; Lezec, H. J.; Hiura, H.; Bennett, J. W.; Ghaemi, H. F.; Thio, T. Electrical conductivity of individual carbon nanotubes. *Nature* **1996**, *382* (6586), 54-56.

<sup>187</sup> Ajiki, H.; Ando, T. Aharonov-Bohm Effect in Carbon Nanotubes. *Physica B* **1994**, *201*, 349-352.

<sup>188</sup> Damnjanovic, M.; Milosevic, I.; Vukovic, T.; Sredanovic, R. Full symmetry, optical activity, and potentials of single-wall and multiwall nanotubes. *Physical Review B* **1999**, *60* (4), 2728-2739.

<sup>189</sup> Berber, S.; Kwon, Y. K.; Tomanek, D. Unusually high thermal conductivity of carbon nanotubes. *Physical Review Letters* **2000**, *84* (20), 4613-4616.

<sup>190</sup> Iijima, S.; Brabec, C.; Maiti, A.; Bernholc, J. Structural flexibility of carbon nanotubes. *Journal of Chemical Physics* **1996**, *104* (5), 2089-2092.

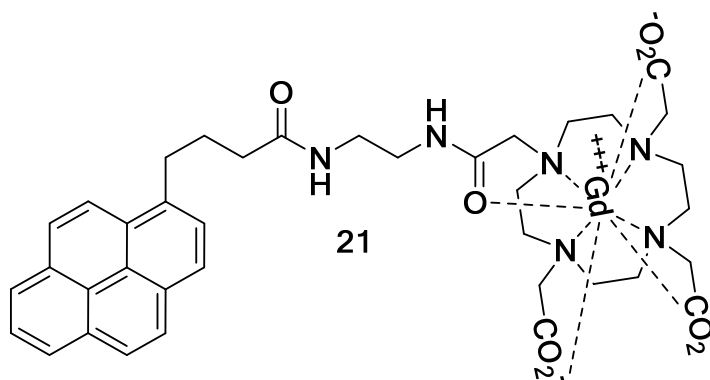
#### 4.4. SÍNTESIS DE LIGANDOS DERIVADOS DE PIRENO CON COMPLEJOS DE Gd(III) BASADOS EN DOTA MONO AMIDA (DOTAma)

Para la funcionalización de los nanotubos de carbono a través de formación de aductos por interacciones  $\pi-\pi$  se diseñan y sintetizan diferentes derivados basados en la estructura de DOTA mono amida (DOTAma). Las características de estos complejos están pensadas para influir en distintos parámetros que podrían modificar la eficiencia del aducto obtenido como agente de contraste en MRI.

Los parámetros involucrados, en nuestro diseño, para mejorar la eficacia del posible agente de contraste multimodal serán:

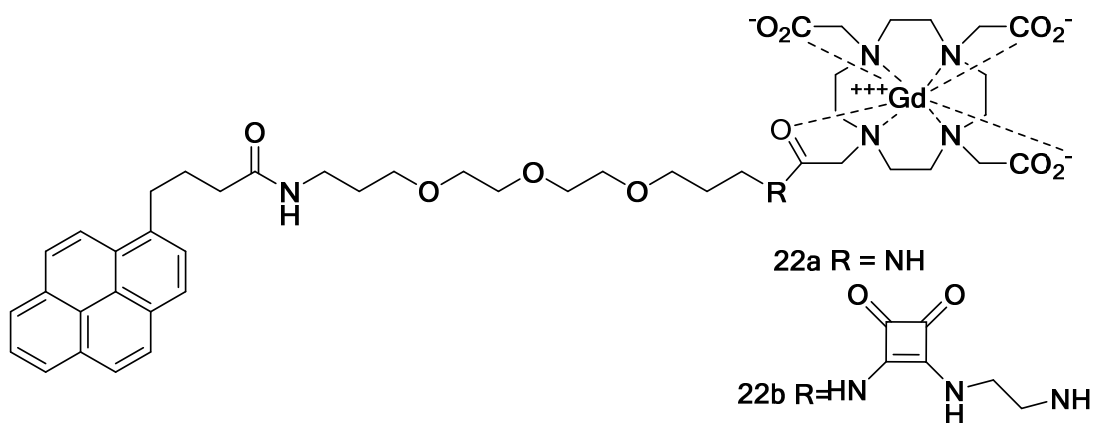
- ✓ Favorecer la solubilidad en agua;
- ✓ Aumentar las interacciones  $\pi-\pi$  entre la sonda paramagnética y la superficie del nanotubo de carbono;
- ✓ Incrementar la relajatividad del sistema.

En primer lugar, y considerando estos factores, se diseñan dos derivados muy similares ambos con una unidad de pireno y con una unidad de complejo de Gd(III) con diferente espaciador entre el anillo pirénico y la jaula de coordinación del metal: en un primer lugar se plantea la utilización de etilendiamina, que dará lugar al complejo (21) a través de una ruta sintética breve.



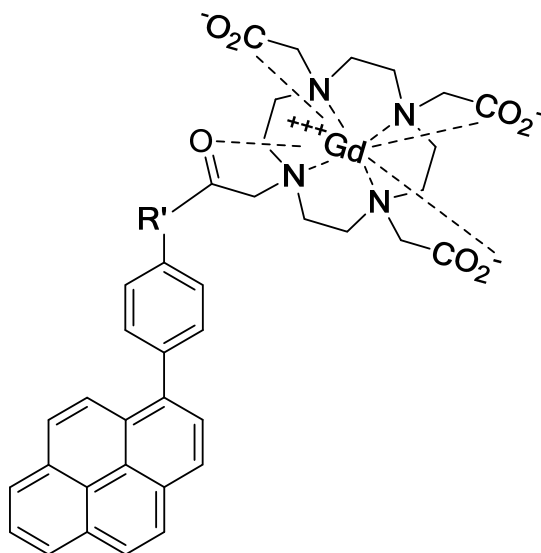
21 Gd(III) DOTAmEtilendiamina Pireno

En segundo lugar, se propone un derivado diamino polietilenglicol (22 Gd(III) ), que con la presencia de los oxígenos favorecerá la solubilidad en agua del aducto con el nanotubo debido a la posible formación de puentes de hidrogeno con los protones del agua.



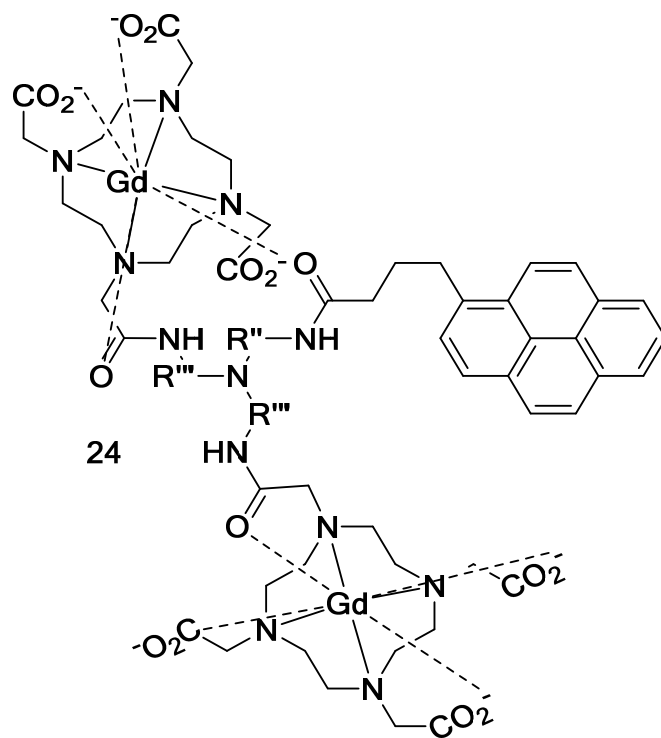
22 Gd(III) DOTAmPegPireno

Para incrementar la fuerza de las interacciones  $\pi$ - $\pi$  se diseña el derivado 23 que lleva un anillo aromático acoplado al anillo pirénico presente en todos los demás derivados y cuya fórmula general se muestra a continuación.



23 Gd(III) DOTAmBencenoPireno

Con el fin de aumentar la relajatividad del sistema se propone el derivado 24 que lleva dos unidades de complejo de Gd(III), como se muestra en la fórmula general siguiente:



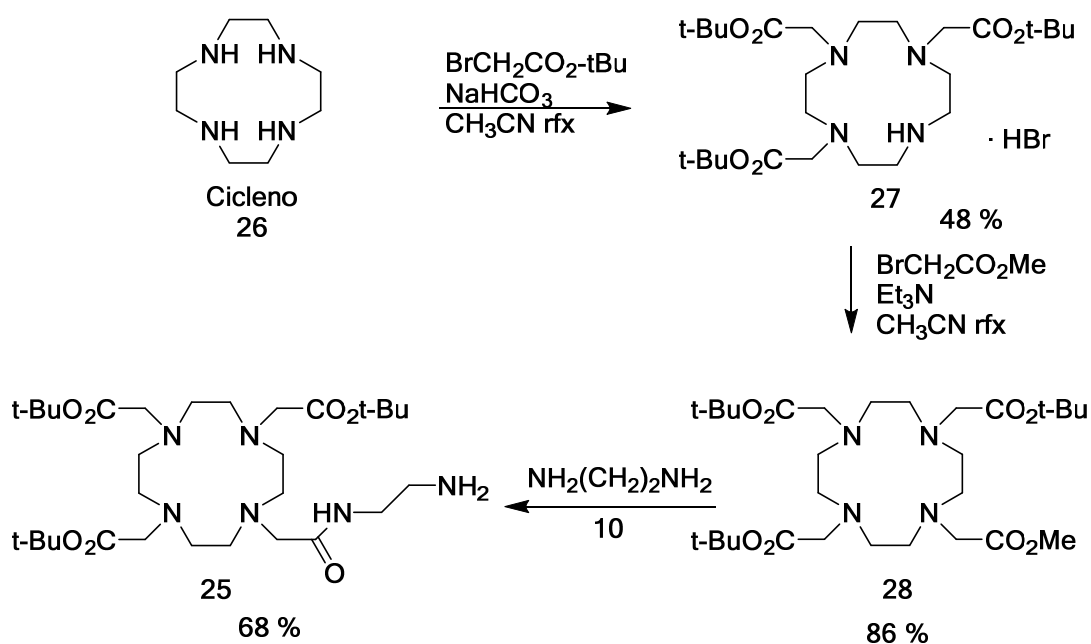
24 BisDOTAmaPireno

En los apartados siguientes se procederá a la descripción detallada de la síntesis y la caracterización de los complejos obtenidos en esta Tesis.

## 4.4.2. Derivados con un complejo de Gd(III) y con espaciadores diferentes entre pireno y tetraazamacrociclo

### 4.4.2.1. Gd(III) DOTAmaEtilendiaminaPireno (21)

La primera aproximación sintética que conduce a la obtención de esta molécula es la síntesis de DOTAmaEtilendiamina 25, según el esquema sintético siguiente:



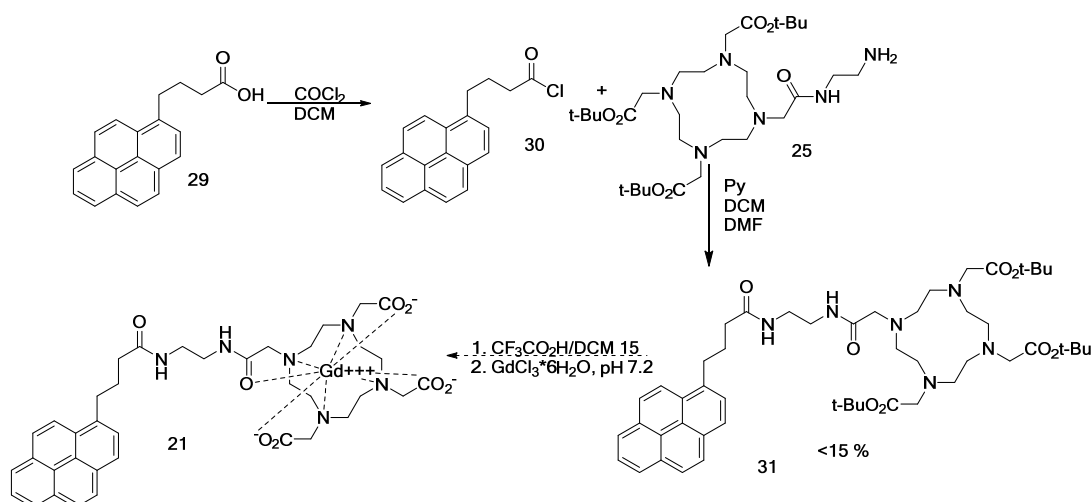
Esquema Sintético 2. DOTAmaEtilendiamina

El éster 25 se ha sintetizado por alquilación de cicleno (1,4,7,10-tetrazaciclododecano) (26), con bromo acetato de *tert*-butilo en  $\text{CH}_3\text{CN}$ , en presencia de  $\text{NaHCO}_3$ , que conduce a la formación del éster *tert*-butílico de DO3A (1,4,7-tris[*tert*-butoxicarbonilmetil]-1,4,7,10-tetrazaciclododecano) (27) en forma de hidrobromuro) con un rendimiento de 48%, de acuerdo con el Esquema Sintético 2.<sup>191</sup> Seguidamente, la alquilación de 27 con bromo acetato de metilo en  $\text{CH}_3\text{CN}$ , utilizando  $\text{K}_2\text{CO}_3$  como base, condujo al éster 28 con buen rendimiento (86%). Finalmente, la reacción de 28 con etilendiamina, empleando las condiciones descritas por Andre y

<sup>191</sup> Dadabhoy, A.; Faulkner, S.; Sammes, P. G. Long wavelength sensitizers for europium(III) luminescence based on acridone derivatives. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **2002**, (2), 348-357.

colaboradores<sup>192</sup> dio lugar a **25** (68%), con un rendimiento global de un 28%.

El paso siguiente consiste en la activación *in situ* del ácido pirenilbutírico (**29**) en forma de cloruro de ácido (**30**) mediante el empleo de cloruro de oxalilo y la posterior condensación con DOTAmEtilendiamina **25** en presencia de piridina en disolventes polares como DCM y DMF.<sup>193</sup>



**Esquema Sintético 3.** DOTAmEtilendiaminaPireno via cloruro de pirenil butírico

El producto de condensación **31** se obtiene con rendimientos muy escasos, inferiores al 15%. La hidrólisis de los ésteres *tert*-butilicos se lleva a cabo en condiciones de ácido trifluoroacético en DCM, dando lugar a la hidrólisis parcial de los ésteres, como se confirma por HPLC-MS, donde se encuentran los picos relativos a los productos de mono y bis desprotección.

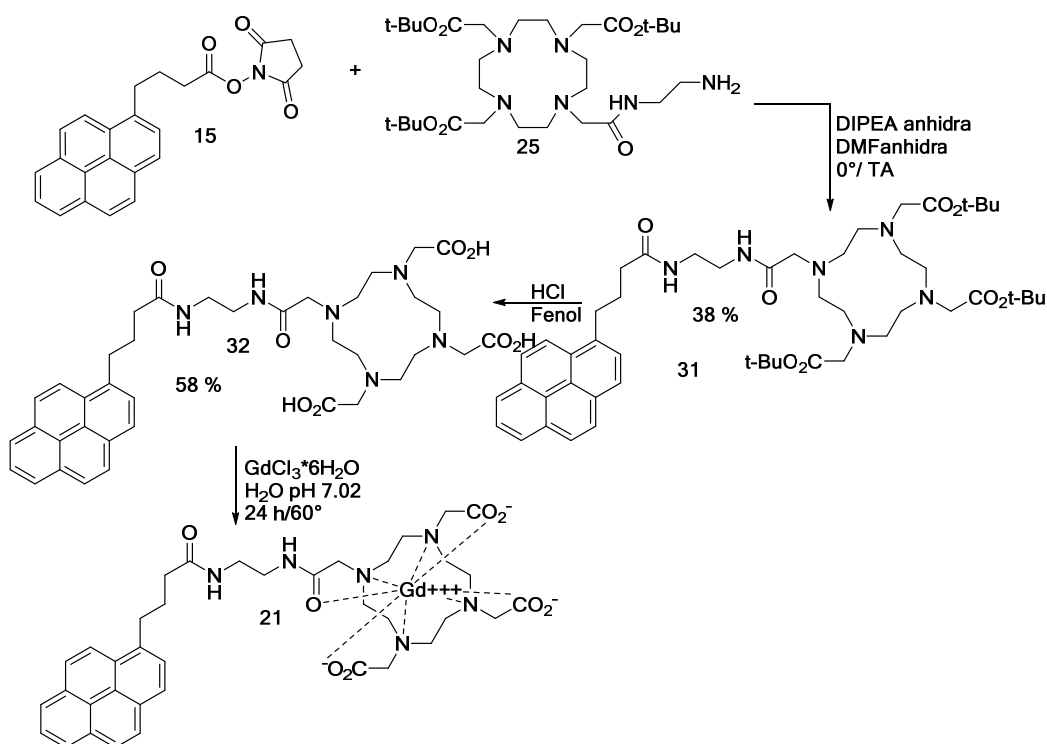
Se realiza una prueba de hidrólisis de los esteres *tert*-butilicos de DOTAmEtilendiamina manteniendo las condiciones de TFA en DCM y alargando el tiempo de reacción, obteniéndose los ácidos libres solo tras 24 horas de reacción. Debido al bajo del rendimiento sintético de

<sup>192</sup> Andre, J. P.; Geraldles, C. F. G. C.; Martins, J. A.; Merbach, A. E.; Prata, M. I. M.; Santos, A. C.; de Lima, J. J. P.; Toth, E. Lanthanide(III) complexes of DOTA-glycoconjugates: A potential new class of lectin-mediated medical imaging agents. *Chemistry-A European Journal* **2004**, 10 (22), 5804-5816.

<sup>193</sup> Uruma, Y.; Sugiura, M.; Harumoto, T.; Usuki, Y.; Iio, H. Synthesis of fluorescent molecular probes specific for the receptor of blepharismone, a mating-inducing pheromone of the ciliate *Blepharisma japonicum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, 15 (4), 1622-1627.

condensación y a la dificultad de la hidrólisis de los ácidos en estas condiciones se ensaya otra ruta sintética.

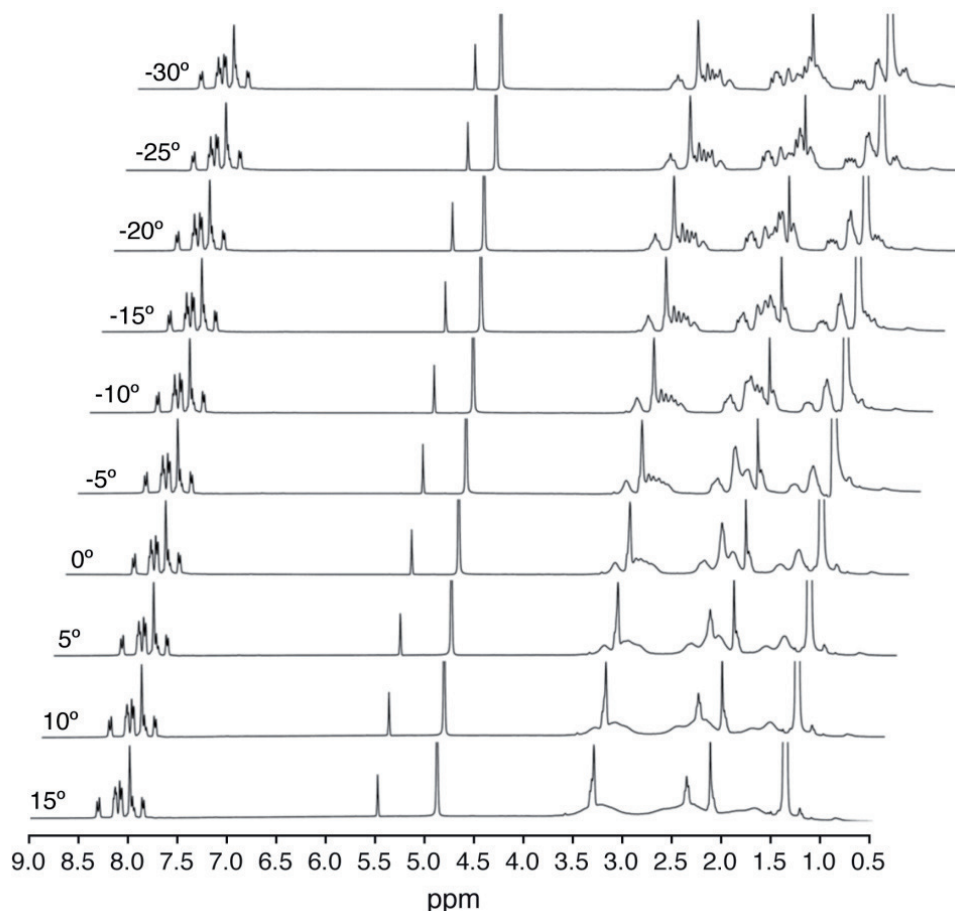
La ruta sintética alternativa emplea el ácido pirenilbutírico en la forma activada de *N*-hidroxisuccinimida **15** que proporciona el producto de condensación **31**, en presencia de DIPEA en DMF, con un rendimiento de 38%.



**Esquema Sintético 4.** DOTAmaEtilendiaminaPireno via ácido pirenilbutírico *N*-hidroxisuccinimida.

Para su caracterización por RMN, además de los rutinarios espectros de protón y de carbono se realiza un estudio a temperatura variable en intervalos de  $5^\circ\text{C}$ , desde  $20^\circ\text{C}$  hasta  $-25^\circ\text{C}$ . Este estudio intenta resolver la zona alifática ya que el tetraazamacrociclo es muy flexible a temperatura ambiente y sus metilenos originan señales muy anchas. Bajando la temperatura se observa como la zona alifática (3.5 - 1.5 ppm) se resuelve, a pesar de lo cual, no ha sido posible observar señales con multiplicidades claras como se muestra en la Figura 4.49.



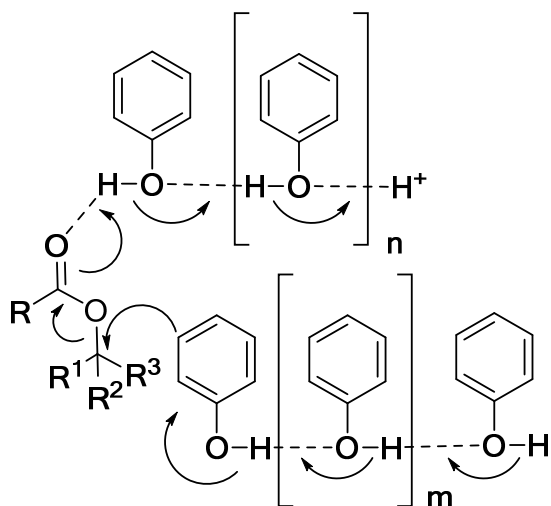


**Figura 4.49.** Espectros de  $^1\text{H}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a temperatura variable de **31**

La hidrólisis se lleva a cabo siguiendo la metodología de Torii y colaboradores,<sup>194</sup> que emplea fenol como disolvente en presencia de ácido y explica el mecanismo de la hidrólisis postulando la existencia de una red de puentes de hidrógenos en la matriz del fenol. Los protones necesarios para la ruptura pueden ser suministrados inicialmente por los ácidos presentes, en el caso concreto el clorhídrico, y posteriormente por vía catalítica por un proceso de sustitución electrófila aromática (SEAr) que incluye un nucleófilo, como es el fenol. Aunque en estas condiciones se espera una baja concentración de protones, estos podrían ser transferidos de forma eficaz al centro de reacción a través de los enlaces de hidrogeno

<sup>194</sup> Torii, S.; Tanaka, H.; Taniguchi, M.; Kameyama, Y.; Sasaoka, M.; Shiroy, T.; Kikuchi, R.; Kawahara, I.; Shimabayashi, A.; Nagao, S. Deprotection of Carboxylic Esters of Beta-Lactam Homologs - Cleavage of Para-Methoxybenzyl, Diphenylmethyl, and Tert-Butyl Esters Effected by A Phenolic Matrix. *Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56 (11), 3633-3637.

de la matriz fenólica. Consecuentemente, la energía de activación involucrada en este proceso ha de ser pequeña. Por lo tanto este fenómeno de transferencia de protones es el responsable del aumento de la velocidad de reacción de hidrólisis en ambiente fenólico (Figura 4.50).



**Figura 4.50.** Mecanismo hidrólisis ésteres en presencia de fenol<sup>194</sup>

El producto de hidrólisis **32** se obtiene con un rendimiento del 58%. El rendimiento global de la síntesis convergente que ha dado lugar al ácido **32**, es de 19%. La formación del complejo de Gd(III) tiene lugar a pH=7.02 en agua empleando tricloruro de gadolinio hexahidratado, según el método descrito por Rudovsky.<sup>195</sup> La caracterización de las propiedades de relajación del complejo se describirá en el apartado 4.6.2 sobre la relajatividad, donde se compararan todos los complejos obtenidos.

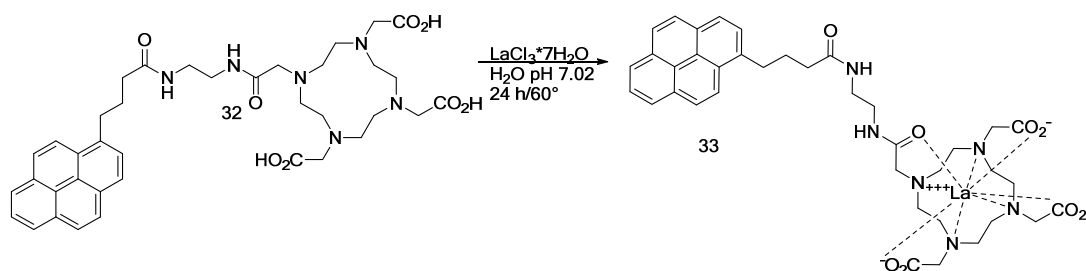
Además del complejo de gadolinio se sintetiza también el correspondiente complejo de lantano **33** (Esquema Sintético 5).

En este caso se lleva a cabo la complejación por adiciones sucesivas de  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , siempre manteniendo el pH entre 6 y 7 y comprobando el

<sup>194</sup> Torii, S.; Tanaka, H.; Taniguchi, M.; Kameyama, Y.; Sasaoka, M.; Shiroy, T.; Kikuchi, R.; Kawahara, I.; Shimabayashi, A.; Nagao, S. Deprotection of Carboxylic Esters of Beta-Lactam Homologs - Cleavage of Para-Methoxybenzyl, Diphenylmethyl, and Tert-Butyl Esters Effected by A Phenolic Matrix. *Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56* (11), 3633-3637.

<sup>195</sup> Rudovsky, J.; Botta, M.; Hermann, P.; Koridze, A.; Aime, S. Relaxometric and solution NMR structural studies on ditopic lanthanide(III) complexes of a phosphinate analogue of DOTA with a fast rate of water exchange. *Dalton Transactions* **2006**, (19), 2323-2333.

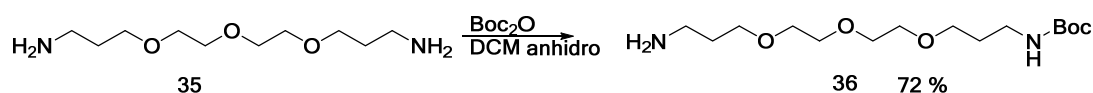
curso de la complejación con el test colorimétrico de naranja de xilenol en tampón acetato.<sup>196</sup>



Esquema Sintético 5. La(III) DOTAmaEtilendiaminaPireno

#### 4.4.2.2. Gd(III) DOTAmaPegPireno (22)

Paralelamente a la síntesis de DOTAmaEtilendiamina **31** se sintetiza DOTAmaPegPireno siguiendo la misma ruta sintética comentada anteriormente (Esquema Sintético 3) que emplea cloruro del ácido pirenilbutírico. En este caso como el nucleófilo es un diamino polietilenglicol, es necesaria la protección de uno de los dos grupos amino para evitar una posible doble condensación. Se protege como carbamato de *tert*-butoxicarbonilo (Boc), empleando dicarbonato de di *tert*-butilo en DCM anhidro, según el esquema sintético siguiente, dando lugar al compuesto **18** con un rendimiento de 72%.

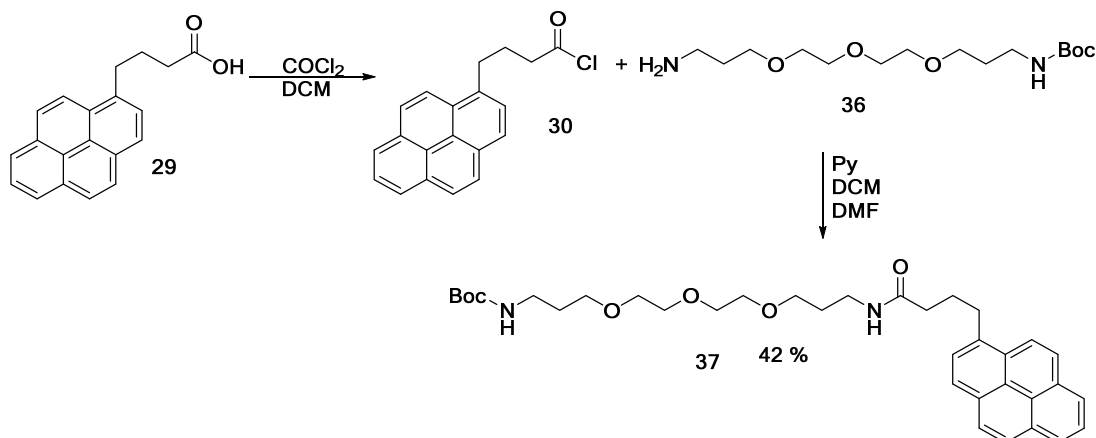


Esquema Sintético 6. (3-(2-(2-(3-aminopropoxy)etoxi)etoxi)propil) carbamato de *tert*-butilo

Posteriormente, y tras la formación del cloruro de ácido *in situ*, tiene lugar la condensación con el compuesto **36** en presencia de piridina en DCM y DMF, que proporciona **37** con un rendimiento del 42%, (Esquema Sintético 7).

<sup>196</sup> Barge, A.; Cravotto, G.; Gianolio, E.; Fedeli, F. How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2006**, 1 (5), 184-188.

La adición del nucleófilo tiene lugar a 0 °C, para incrementar después la temperatura a 25 °C. El rendimiento global de la reacción, hasta la condensación es de 30%.



**Esquema Sintético 7.** (15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil) carbamato de *tert*-butilo via cloruro de ácido.

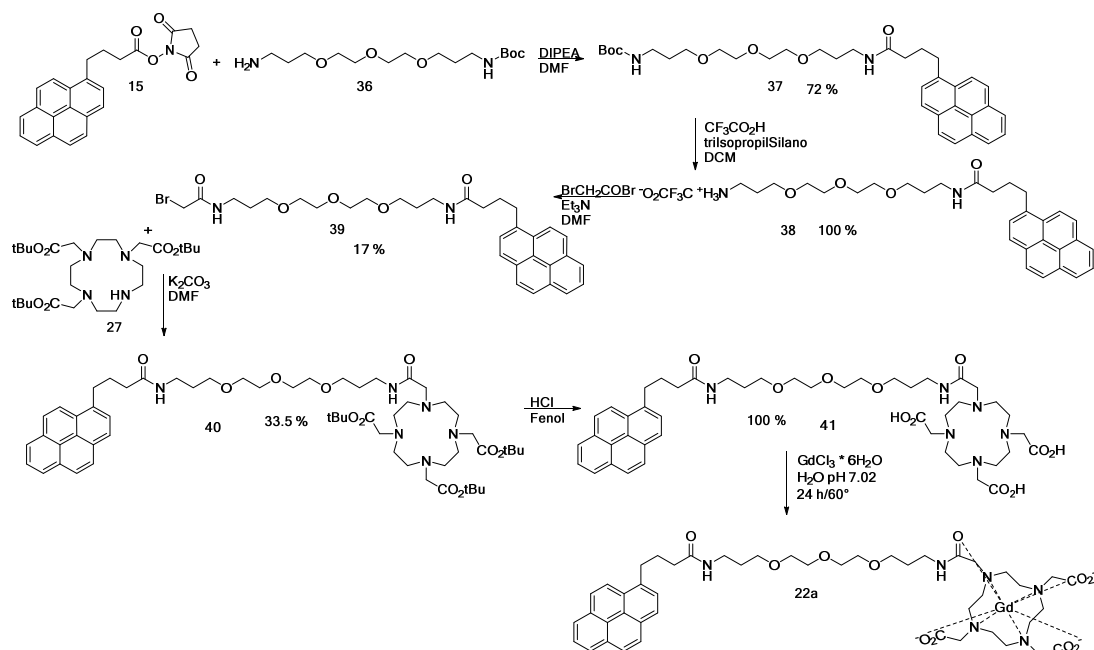
Debido al moderado rendimiento, como ocurrió anteriormente con **31**, se decidió optar por el empleo del ácido pirenilbutírico en la forma activada de *N*-hidroxisuccinimida que rindió el producto de condensación **37** con rendimiento cuantitativo y rendimiento global de 72% (**Esquema Sintético 8**).

El paso siguiente a la condensación es la desprotección de la amina de la forma de carbamato y tiene lugar en las condiciones habituales de ácido trifluoroacético en  $\text{DCM}$  con la adición de triisopropilsilano<sup>197</sup> como “scavenger” de protones, proporcionando **38** con rendimiento cuantitativo.

Como paso siguiente se plantea la condensación de la amina libre **38** con bromuro de bromoacetilo, en presencia de trietilamina como base para liberar la amina de la sal de trifluoroacetato de amonio, que dará lugar al compuesto **39**, obteniendo un rendimiento de tan solo el 17%.

Previamente a la reacción de alquilación con **38**, el éster *tert*-butilico de DO3A **27** se trata con amoniaco gaseoso para liberar la amina de la forma de hidrobromuro con la precipitación de hidrobromuro de amonio y haciéndola más nucleófila.

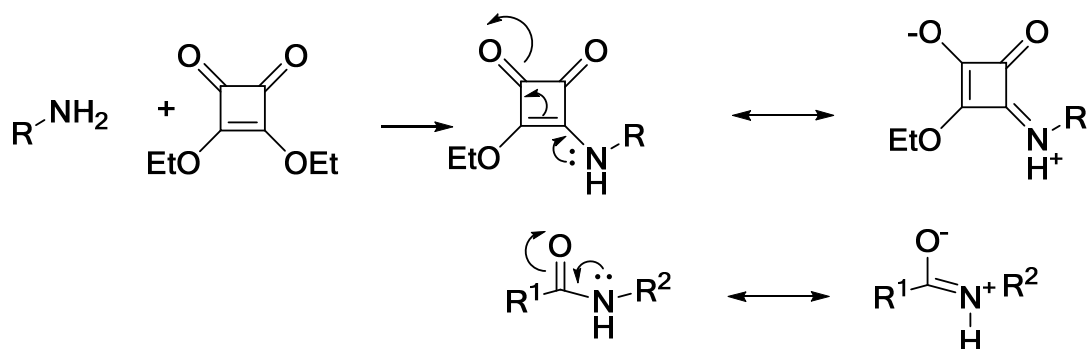
<sup>197</sup> Guiotto, A.; Calderan, A.; Ruzza, P.; Osler, A.; Rubini, C.; Jo, D. G.; Mattson, M. P.; Borin, G. Synthesis and evaluation of neuroprotective alpha,beta-unsaturated aldehyde scavenger histidyl-containing analogues of carnosine. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48* (19), 6156-6161.



**Esquema Sintético 8.** Gd(III) DOTAmPegPireno **22a**.

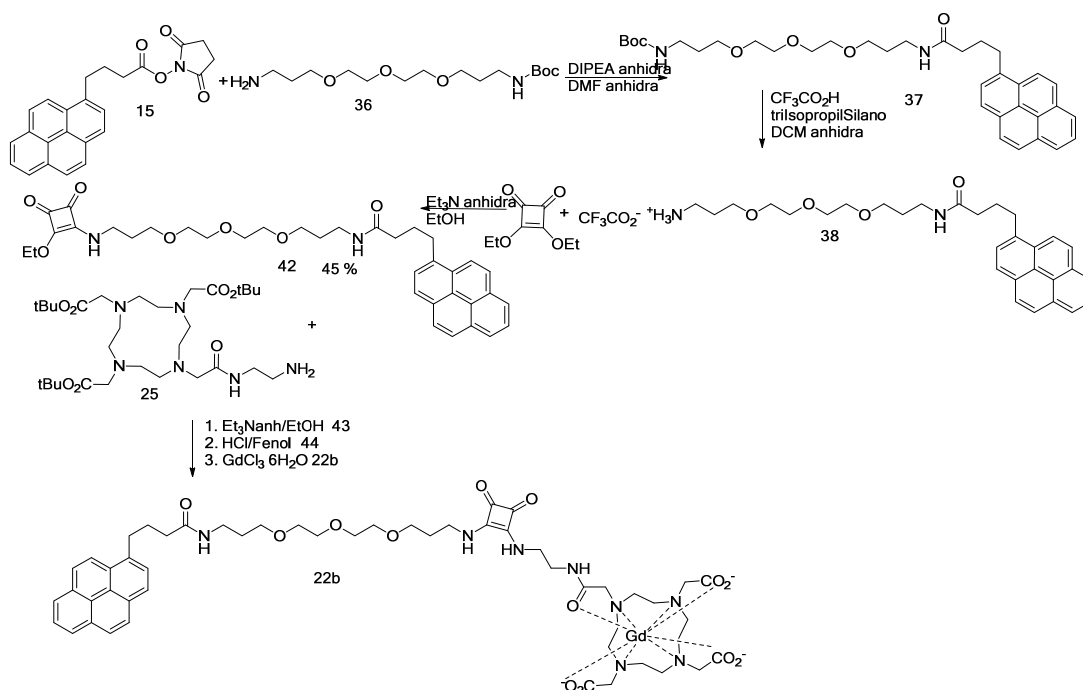
De la alquilación se obtiene **40** con un rendimiento del 33.5%; posteriormente tiene lugar la hidrólisis de los esteres *tert*-butílicos en las condiciones de ácido clorhídrico en fenol que da lugar al ácido **41** con rendimiento cuantitativo. El complejo se obtiene en las mismas condiciones del complejo de DOTAmEtilendiaminaPireno, se confirma su existencia por HPLC-MS.

Tras analizar la ruta sintética se ha decidido sustituir la condensación con bromuro de bromoacetilo, que daba lugar al compuesto **39** con rendimiento muy escaso, por una alquilación con escuarato de dietilo que daría lugar a una amina, cuyo nitrógeno perdería nucleofilia y no se cuaternizaría por ser isómero de un nitrógeno amídico (Figura 4.51).



**Figura 4.51.** Reacción de una amina con escuarato de dietilo: la alquil escuaril amida obtenida es isómera a una amida

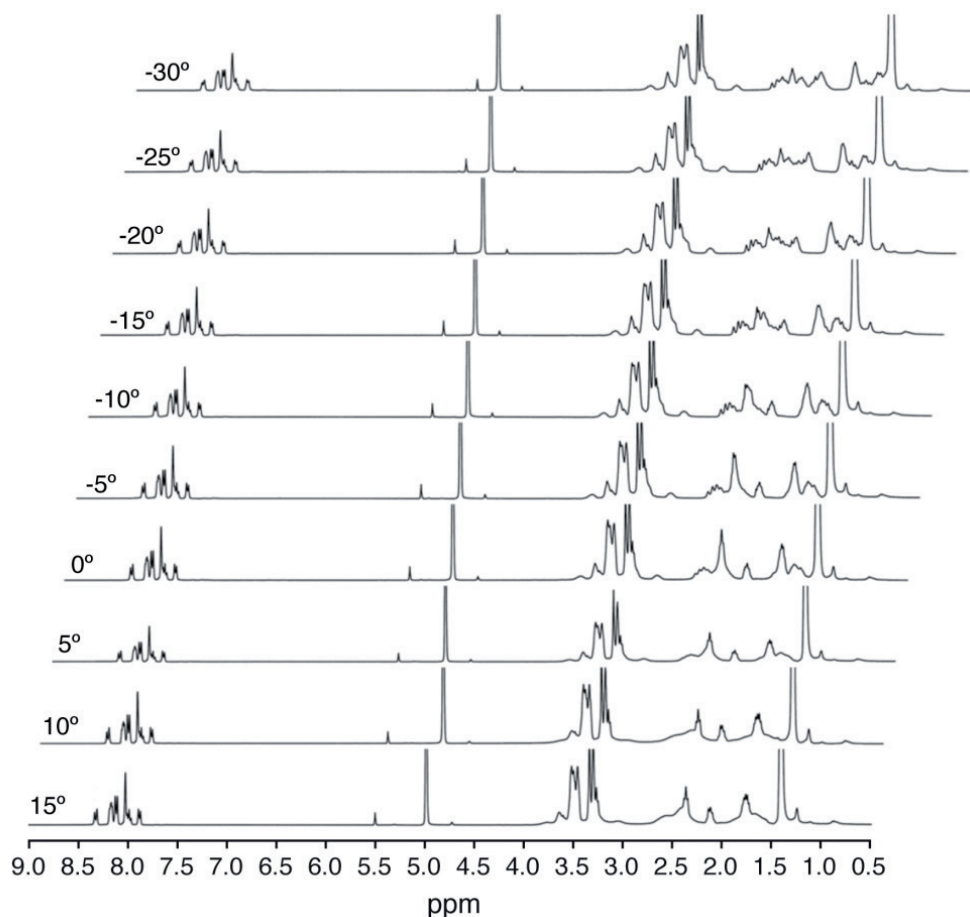
Con el nuevo planteamiento sintético (Esquema Sintético 9), se obtiene el producto de alquilación **42** entre **38** y escuarato de dietilo con un rendimiento de 45%, en esta reacción es necesaria la presencia de trietilamina anhidra para favorecer la liberación de la amina de la forma de trifluoroacetato de amonio.



**Esquema Sintético 9. Gd(III)DOTAmaPegPireno **22b****

La reacción de alquilación entre DOTAmAetilendiamina **25** y **42** proporciona el compuesto **43** con rendimiento de 52%, que tras la hidrólisis de los ésteres *tert*-butílicos en las ya experimentadas condiciones de ácido clorhídrico en fenol, da lugar al ácido **44** con rendimiento cuantitativo. Con esta variación en la ruta sintética, se ha incrementado el rendimiento global alcanzando un 17%.

En este caso también se realiza el estudio de RMN de protón a temperatura variable en intervalos de 5 °C, de 20 °C hasta - 30 °C, para intentar resolver la zona alifática (3.5 - 1.5 ppm) de los metilenos del tetraazamacrociclo. Se observa una progresiva resolución conforme baja la temperatura (Figura 4.52).



**Figura 4.52.** Espectros de  $^1\text{H}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a temperatura variable de **43**

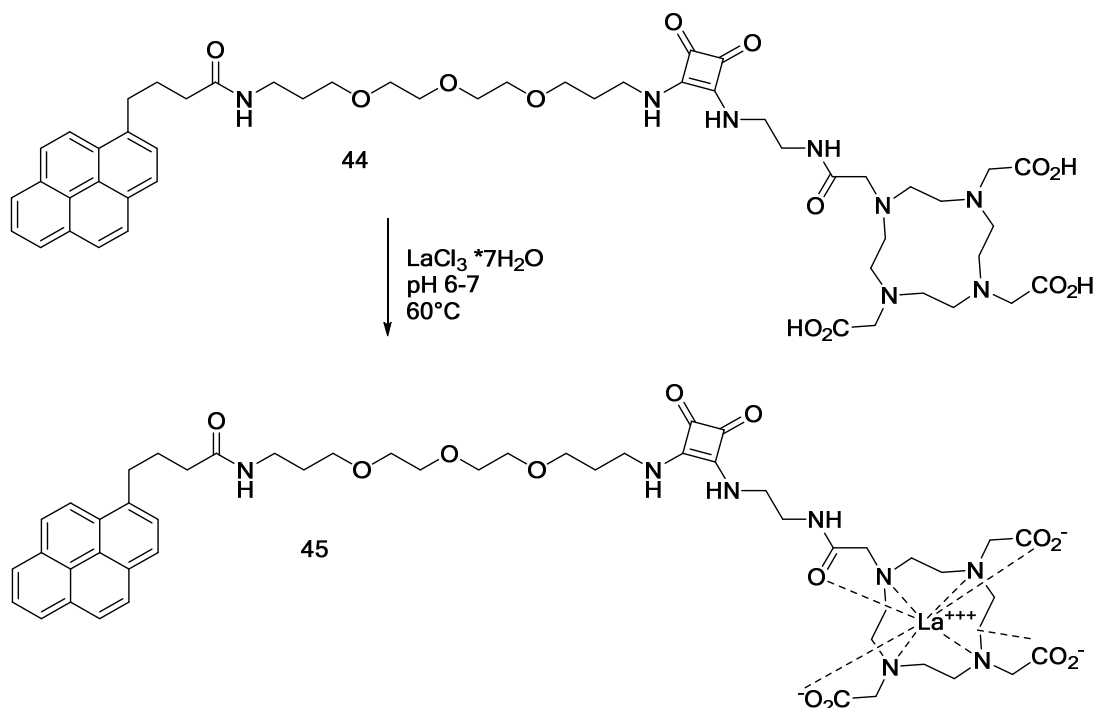
Posteriormente se procede a la formación del complejo de Gd (III) con tricloruro de gadolinio hexahidrato en agua manteniendo el pH entre 6 y 7. En la formación de complejos de Gd es muy importante que el pH no llegue a 8 porque el gadolinio presente en disolución podría precipitar como hidróxido de gadolinio impidiendo la formación del complejo deseado.

En este caso también se comprueba la ausencia de Gd libre con el test colorimétrico de naranja de xilenol.

Las propiedades relaxométricas de este compuesto se describirán en el apartado 4.6.2.

También con este derivado se ha sintetizado el correspondiente complejo de lantano **45** con el mismo método empleado para el complejo de La(III)DOTAmaEtilendiamina, es decir por adiciones sucesiva de cloruro de

lantano heptahidratado y siguiendo el curso de la complejación por el test colorimétrico de naranja de xilenol.<sup>196</sup>



Esquema Sintético 10. La(III)DOTAmaPegPireno

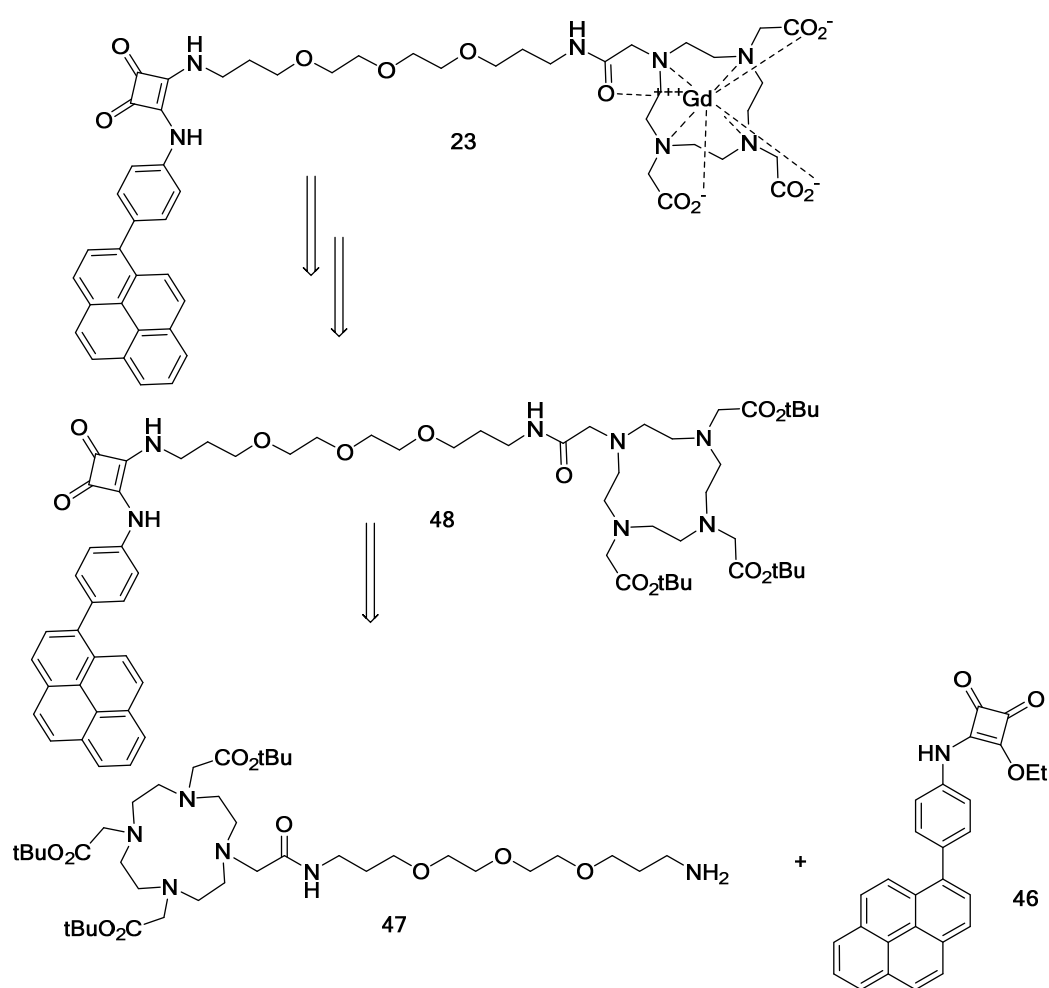
Se han obtenido dos complejos de Gd(III) basados en DOTAma unidos a una molécula de ácido pirenilbutírico a través de dos espaciadores diferentes: en un caso etilendiamina y en otro diamino polietilenglicol.

<sup>196</sup> Barge, A.; Cravotto, G.; Gianolio, E.; Fedeli, F. How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note. *Contrast Media & Molecular Imaging* 2006, 1 (5), 184-188.



### 4.4.3. Derivados con un complejo de Gd(III) y un anillo aromático unido al pireno

Como se ha comentado en el apartado 4.4, se planifica la obtención de un compuesto con un anillo aromático acoplado al anillo pirénico para ver cómo influye en las interacciones  $\pi-\pi$  la presencia de otra unidad aromática. En este caso también se plantea una síntesis de tipo convergente en la cual se obtendrán por separado el producto de acoplamiento (46) y el derivado de DOTA monoamida (47).



**Esquema retrosintético 1.** Retrosíntesis de 2,2',2''-(10-(16-((3,4-dioxo-2-((4-(piren-1-il)fenil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azaheptadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tri-il)triacetato de Gd (III) (23).

Los dos derivados se alquilaran entre sí para dar lugar a 2,2',2''-(10-(16-((3,4-dioxo-2-((4-(piren-1-il)fenil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)-2-oxo-

7,10,13-trioxa-3-azahexadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecane-1,4,7-tri-il) triacetato de tri-*tert*-butilo (48), que después de la hidrólisis proporcionará el complejo deseado (23), (Esquema Retrosintético 1).

#### 4.4.3.1. Compuesto derivado del acoplamiento de Suzuki

Se escoge la reacción de acoplamiento de Suzuki<sup>198,199</sup> para llevar a cabo el acoplamiento entre el pireno y la unidad de benceno, que tiene lugar según el mecanismo general siguiente:

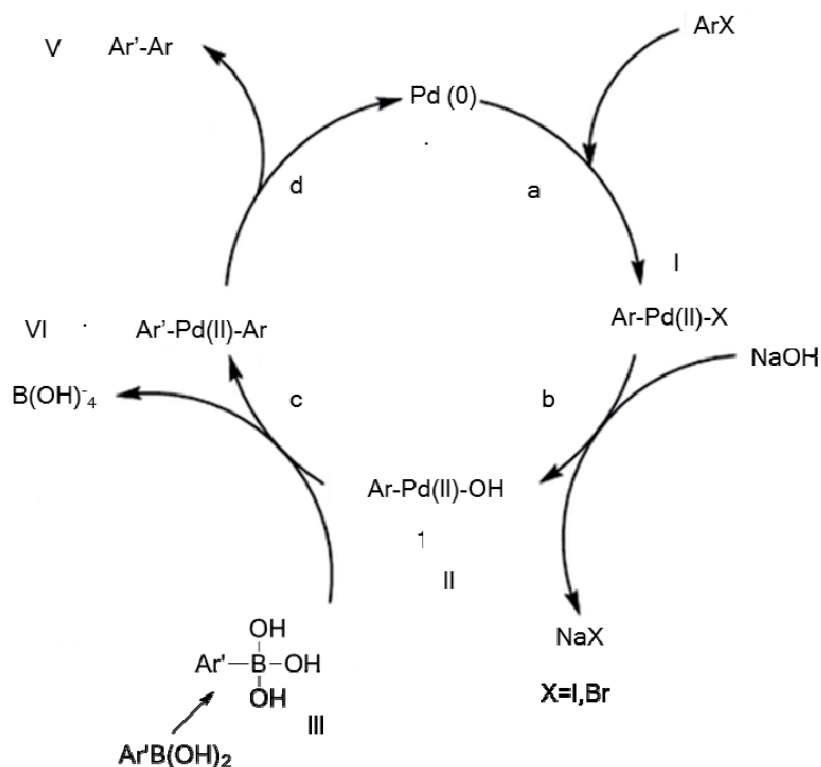


Figura 4.53. Mecanismo de reacción del acoplamiento de Suzuki.

El primer paso de la reacción (a) está constituido por una adición oxidativa de  $\text{Pd}(0)$  a un haluro de arilo que da lugar al intermediario I, el cual reacciona con una base (b), para proporcionar la especie II. La transmetalación (c) con un derivado boronado III produce el compuesto

<sup>198</sup> Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chemical Reviews* **1995**, *95* (7), 2457-2483.

<sup>199</sup> Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. New Stereospecific Cross-Coupling by the Palladium-Catalyzed Reaction of 1-Alkenylboranes with 1-Alkenyl Or 1-Alkynyl Halides. *Tetrahedron Letters* **1979**, *20* (36), 3437-3440.

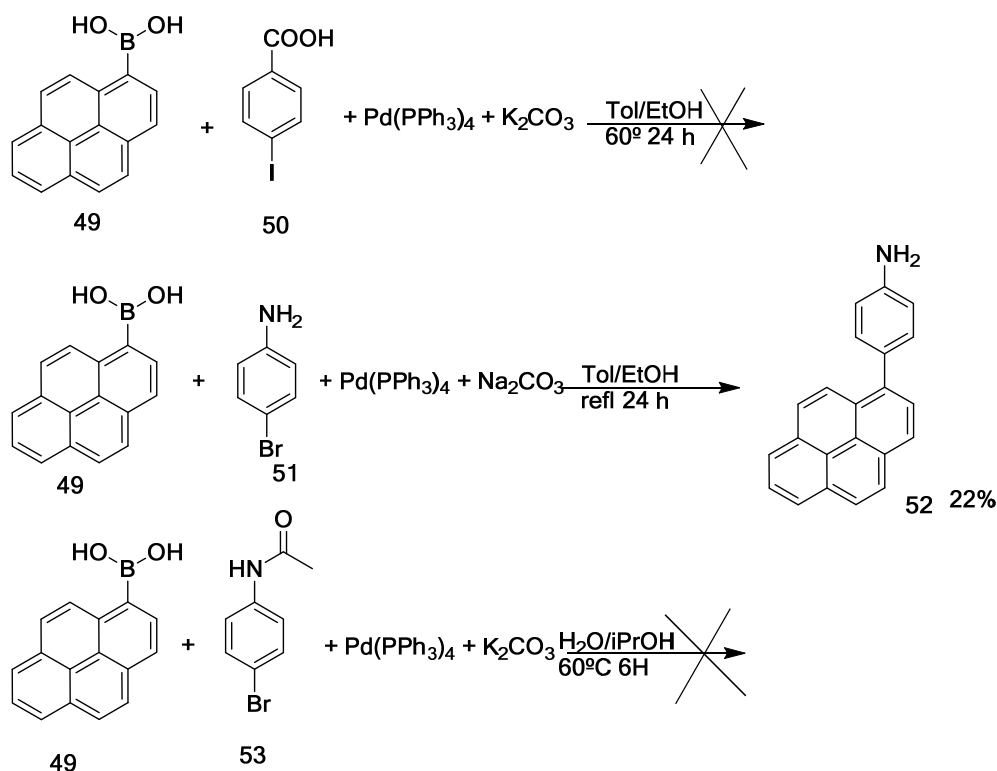
organopaládico, que, tras sufrir una eliminación reductiva (d), proporciona el producto de acoplamiento deseado V y regenera el catalizador.

En nuestro caso el halógeno derivado estará constituido por un derivado de una fenil amina, mientras que el derivado borónico llevará consigo el anillo pirénico.

La reacción de acoplamiento de Suzuki ha requerido mucho tiempo para la obtención del producto ya que, como podemos observar en el **Esquema Sintético 11**, se han llevado a cabo diferentes intentos con distintos reactivos y condiciones. Como organoborano en un primer momento se empleó el ácido pirenilborónico (49),<sup>200</sup> en presencia de paladio tetrakis trifenilfosfina en una mezcla de tolueno y etanol y carbonato sódico o potásico como base. Los halógenos derivados fueron el ácido iodobenzóico (50) en un primer intento y p-bromo anilina (51) en un segundo caso. Solo la reacción con p-bromoanilina dio lugar al producto de acoplamiento 52 con rendimientos bajos (22%), los otros dos intentos no produjeron el producto de acoplamiento. Estos resultados se deben a la escasa solubilidad del ácido borónico en los diferentes disolventes empleados. Se cambiaron también los disolventes para favorecer la solubilidad, medio hidroalcohólico con isopropanol y agua, pero no se observó ninguna mejoría.

---

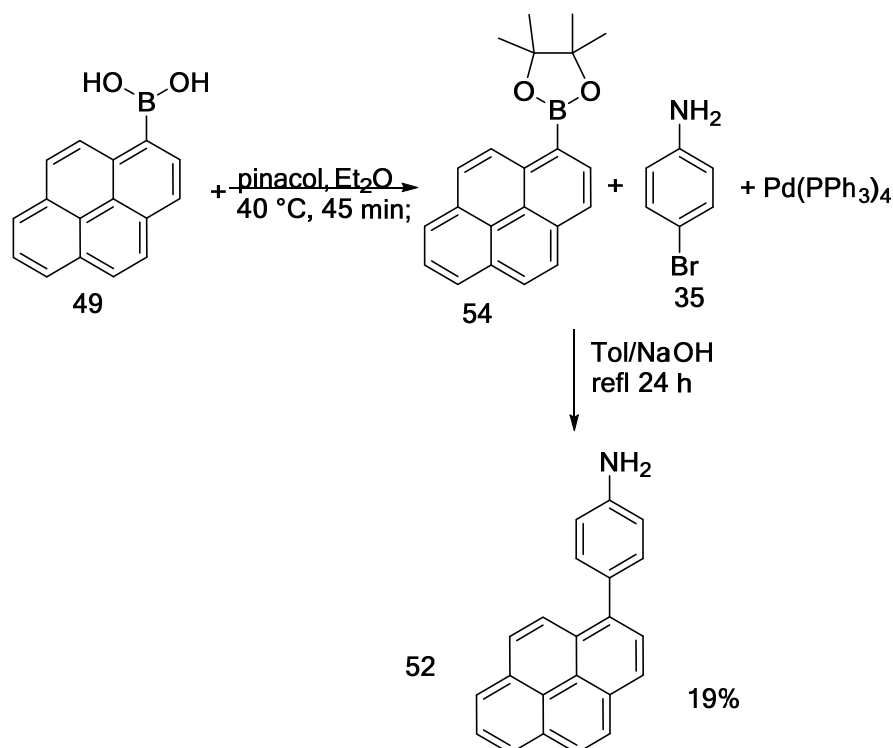
<sup>200</sup> Tao, S.; Zhou, Y.; Lee, C. S.; Lee, S. T.; Huang, D.; Zhang, X. A triphenylamine derivative as a single-emitting component for highly-efficient white electroluminescent devices. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*(33), 3981-3984.



**Esquema Sintético 11.** Intentos de acoplamiento de Suzuki empleando el ácido pirenilborónico.

Para obviar este inconveniente, tras consultar la literatura<sup>201</sup> se decide proteger el ácido pirenilborónico como 4,4,5,5-tetrametil-2-piren-1-il-1,3,2-dioxaborolano (54), por reacción con pinacol en éter, (rendimiento de 75%) y llevar a cabo el acoplamiento de Suzuki en las condiciones descritas por Bheinoff<sup>201</sup> y colaboradores, empleando p-bromoanilina como halógeno derivado, Pd (0) tetrakis trifenilfosfina como catalizador en Tolueno/NaOH. En estas condiciones se solubiliza el reactivo borónico pero se obtiene el producto de acoplamiento (52) con tan solo el 19% de rendimiento (Esquema Sintético 12).

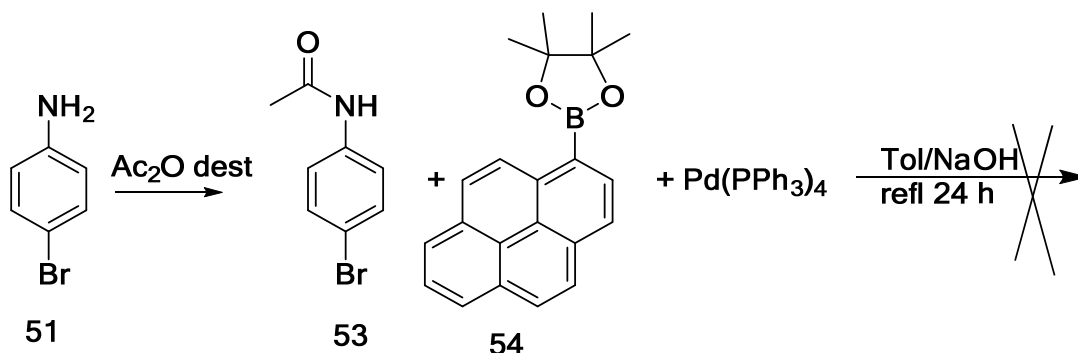
<sup>201</sup> Beinhoff, M.; Weigel, W.; Jurczok, M.; Rettig, W.; Modrakowski, C.; Brudgam, I.; Hartl, H.; Schluter, A. Synthesis and Spectroscopic Properties of Arene-Substituted Pyrene Derivatives as Model Compounds for Fluorescent Polarity Probes. *Eur. J. Org. Chem.* 2001, 2001 (20), 3819-3829.



**Esquema Sintético 12.** Intento de acoplamiento de Suzuki entre ácido borónico protegido como dioxaborolano y p-bromoanilina

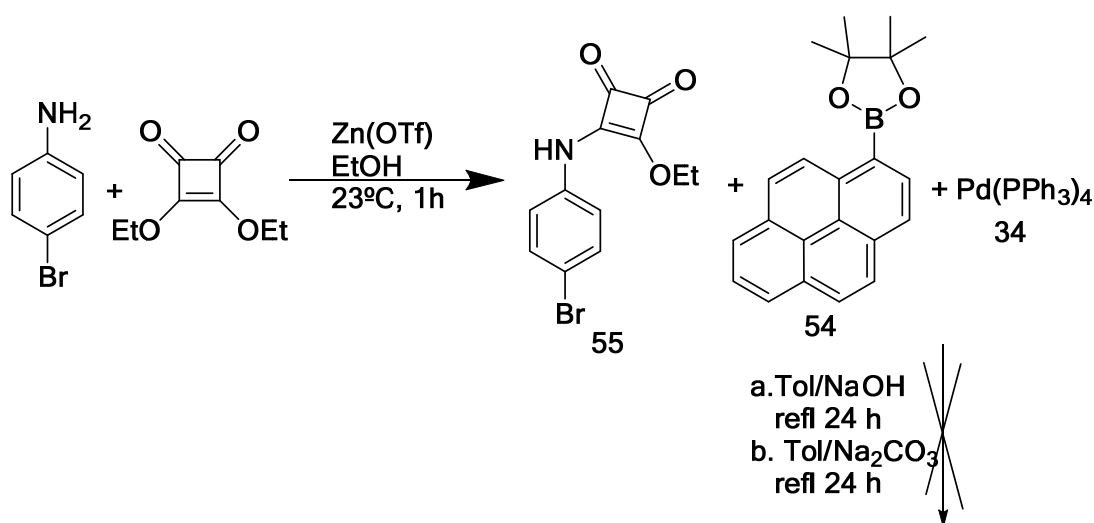
Dado el escaso rendimiento, se decide cambiar la sosa por carbonato sódico para ver si influye en la reacción, pero tampoco se obtiene el producto de acoplamiento y en HPLC-MS se identifican solo los productos de partida.

Se opta entonces por proteger el grupo amino pensando que este grupo hubiese podido interferir en la reacción de Suzuki envenenando el catalizador. Se realizan dos pruebas: una primera protegiendo p-bromoanilina como p-bromoacetanilida (**53**) con anhídrido acético destilado. Sin embargo la reacción de acoplamiento tampoco da lugar al producto de acoplamiento esperado (**Esquema Sintético 13**).



**Esquema Sintético 13.** Intento de acoplamiento de Suzuki entre ácido pirenilborónico protegido como dioxaborolano y p-bromoacetanilida.

La segunda prueba consiste en funcionalizar p-bromoanilina con escuarato de dietilo siguiendo las condiciones descritas por Rostami,<sup>202</sup> que emplean triflato de cinc, que actúa como ácido de Lewis, en la formación de las aril escuaramidas en una reacción rápida y con buenos rendimientos (67%), para posteriormente realizar la reacción de acoplamiento de Suzuki.



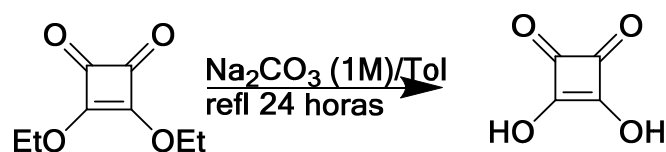
**Esquema Sintético 14.** Intento de acoplamiento de Suzuki entre ácido pirenilborónico protegido como dioxaborolano y 3-((4-bromofenil)amino)-4-etoxiciclobut-3-ene-1,2-diona (55).

La reacción se lleva a cabo tanto en presencia de sosa, como de carbonato sódico, pero en ningún caso se observa el producto de condensación esperado ya que en HPLC-MS se observan los picos pertenecientes a los productos de partida y a p-bromoanilina, lo que hace

<sup>202</sup> Rostami, A.; Colin, A.; Li, X. Y.; Chudzinski, M. G.; Lough, A. J.; Taylor, M. S. *N,N'*-Diarylsquaramides: General, High-Yielding Synthesis and Applications in Colorimetric Anion Sensing. *Journal Organic Chemistry* **2010**, *75*, 3983-3992.

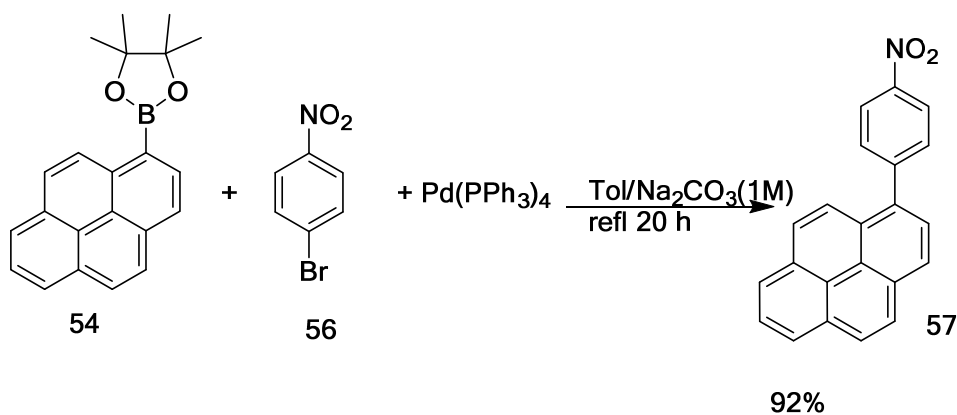
pensar a la hidrólisis del enlace entre el nitrógeno de la anilina y el escuarato de etilo, debido a la presencia de un ambiente básico (**Esquema Sintético 14**).

Para confirmar la hidrólisis del enlace se realiza una prueba poniendo a reaccionar a reflujo durante 24 horas escuarato de dietilo con una disolución acuosa 1M de carbonato sódico en Tolueno. Al cabo de ese tiempo se analiza el crudo de reacción por HPLC-MS y se observa solo el pico perteneciente al producto dihidrolizado (**Esquema Sintético 15**).



**Esquema Sintético 15.** Hidrólisis escuarato de dietilo.

Dado el escaso éxito obtenido con grupos NH libres en los halógeno derivados, se decide emplear un halógeno derivado con un grupo electrón atrayente, concretamente 1-bromo-4-nitrobenceno (**56**), que por reducción posterior del grupo nitro proporcionaría la amina. La reacción se lleva a cabo en las mismas condiciones, empleando como catalizador paladio tetrakis trifenilfosfina en presencia de una disolución acuosa 1M de carbonato sódico en tolueno, a reflujo durante 20 horas. Como en los casos anteriores antes de la adición del catalizador se desgasifican los disolventes burbujeando helio durante dos horas.

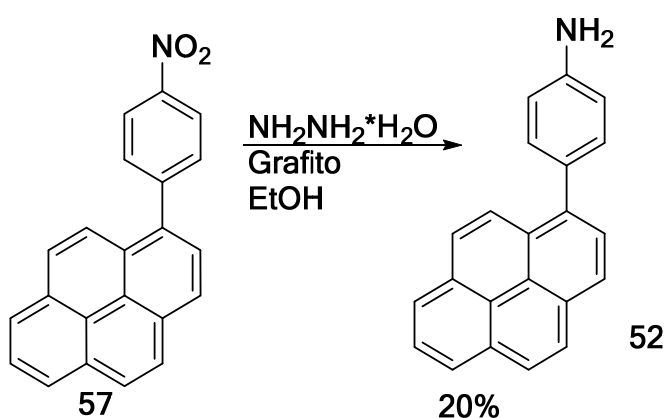


**Esquema Sintético 16.** Acoplamiento de Suzuki entre pinacoil borónico y p-bromo-nitrobenceno.

La reacción tiene lugar proporcionando el producto de acoplamiento 57 con un rendimiento del 92%.

Tras obtener el producto de Suzuki (57) se realizan diferentes pruebas de reducción del grupo nitro a amina en diferentes condiciones.

La primera reducción se realiza siguiendo las condiciones descritas por Bullock y colaboradores<sup>203</sup> que emplean hidracina monohidratada, en presencia de grafito en tolueno que dan lugar a la correspondiente p-pirenilanilina con un rendimiento de tan solo el 20% (Esquema Sintético 17).



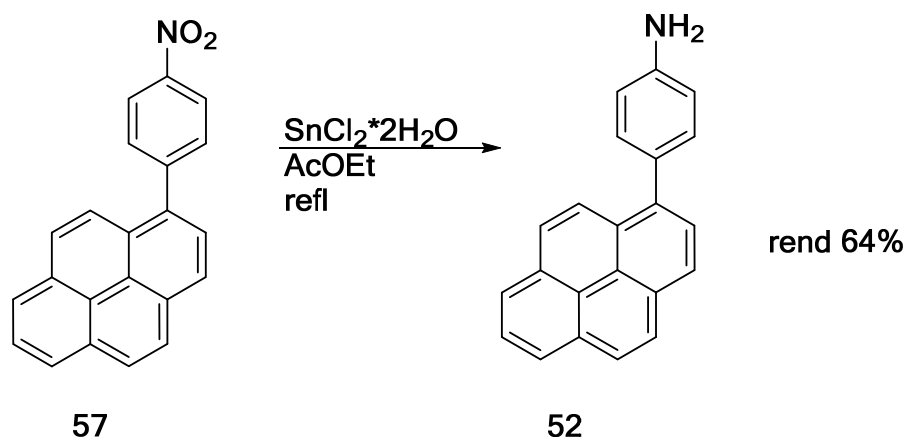
**Esquema Sintético 17.** Reducción nitro en presencia de hidracina.

Las condiciones siguientes son las descritas por Suryadevara,<sup>204</sup> que emplean cloruro estánico en acetato de etilo y proporcionan el compuesto 52 con un rendimiento del 64% (Esquema Sintético 18).

<sup>203</sup> Bullock, J. E.; Carmieli, R.; Mickley, S. M.; Vura-Weis, J.; Wasielewski, M. R. Photoinitiated Charge Transport through pi-Stacked Electron Conduits in Supramolecular Ordered Assemblies of Donor-Acceptor Triads. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (33), 11919-11929.

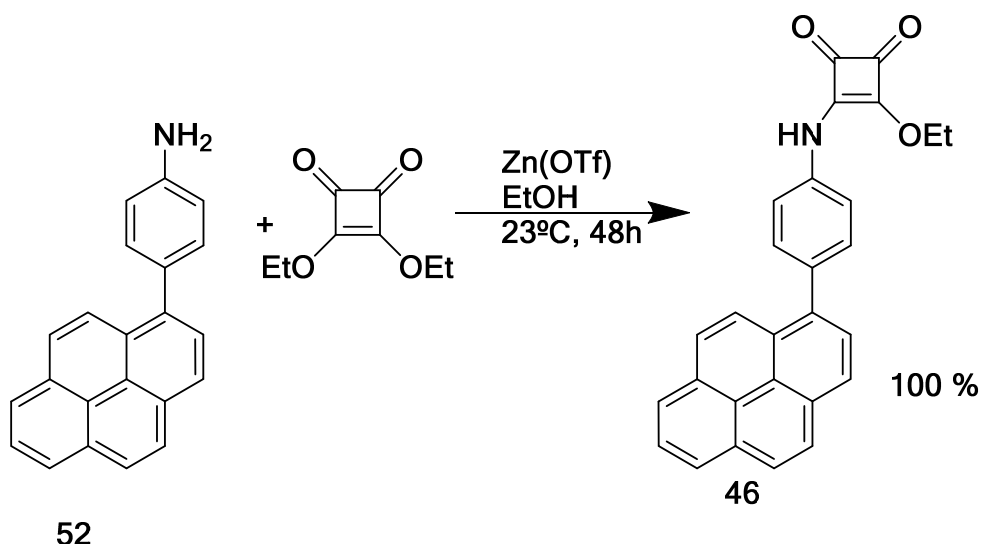
<sup>204</sup> Suryadevara, P. K.; Olepu, S.; Lockman, J. W.; Ohkanda, J.; Karimi, M.; Verlinde, C. L.; Kraus, J. M.; Schoepe, J.; Van Voorhis, W. C.; Hamilton, A. D.; Buckner, F. S.; Gelb, M. H. Structurally Simple Inhibitors of Lanosterol 14 alpha-Demethylase Are Efficacious In a Rodent Model of Acute Chagas Disease. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52* (12), 3703-3715.





**Esquema Sintético 18.** Reducción 4-pirenilNitroBenceno con cloruro estánico.

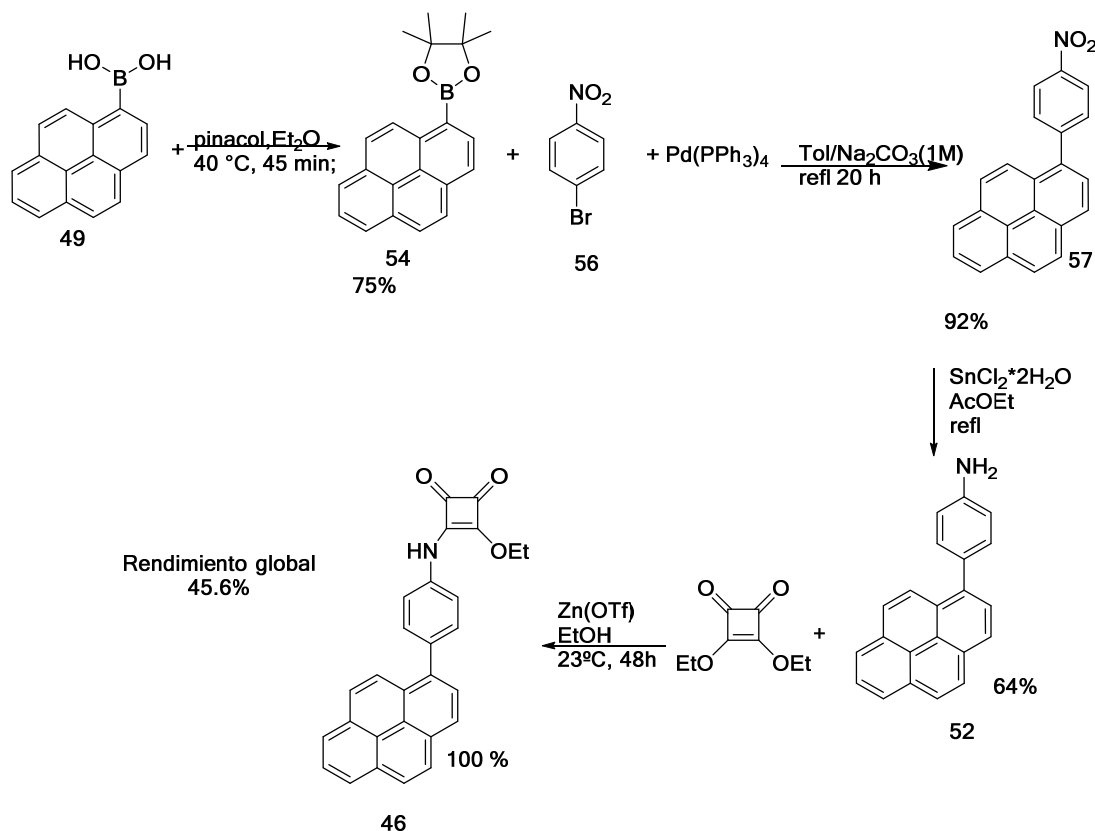
Para la obtención del derivado 46, se alquila 4-(piren-1-il) anilina 52 con escuarato de dietilo según las condiciones de Rostami<sup>202</sup> anteriormente citadas. La reacción tiene lugar con rendimiento cuantitativo.



**Esquema Sintético 19.** Alquilación 4-(piren-1-il) anilina con escuarato de dietilo.

A continuación se muestra a modo de resumen el esquema sintético seguido para la obtención de 46, cuyo rendimiento global ha sido bastante bueno (45.6%).

<sup>202</sup> Rostami, A.; Colin, A.; Li, X. Y.; Chudzinski, M. G.; Lough, A. J.; Taylor, M. S. N,N'-Diarylsquaramides: General, High-Yielding Synthesis and Applications in Colorimetric Anion Sensing. *Journal Organic Chemistry* **2010**, 75, 3983-3992.

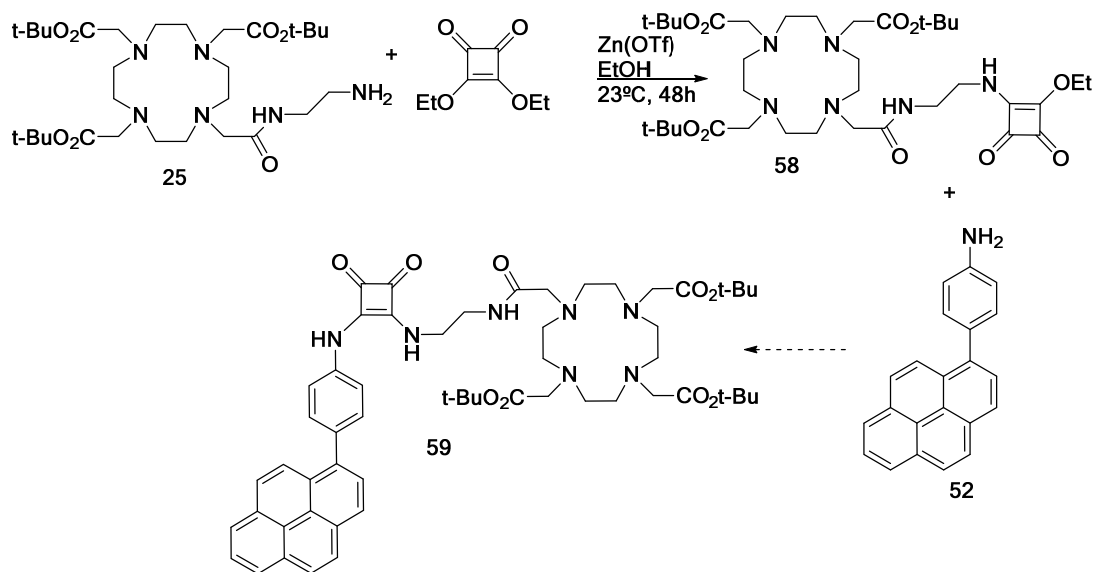


Esquema Sintético 20. Ruta sintética seguida para la obtención de 46

#### 4.4.3.2. Alquilación del derivado de Suzuki y DOTAmaEtilendiamina

Como se ha comentado en la introducción del apartado 4.4.3, la síntesis que se ha escogido es de tipo convergente y una vez obtenido el derivado del acoplamiento de Suzuki se ha procedido con la síntesis de la parte que lleva la jaula de coordinación del Gd(III). En primer lugar, se decide alquilar DOTAmaEtilendiamina (25) con escarato de dietilo para posteriormente alquilar directamente el derivado obtenido con 4-piren-1-il anilina (52), según el hipotético esquema que se presenta a continuación (Esquema Sintético 21).

En realidad, la reacción de alquilación de 25 con escarato de dietilo da lugar al producto 58 con un rendimiento de tan solo el 16%, por lo que se decide abandonar esta posible ruta sintética.



**Esquema Sintético 21.** Alquilación de DOTAmEtilendiamina con escuarato de dietilo y posterior alquilación con 4piren-1-il anilina.

#### 4.4.3.3. Derivado de DOTAmPegNH<sub>2</sub> (47)

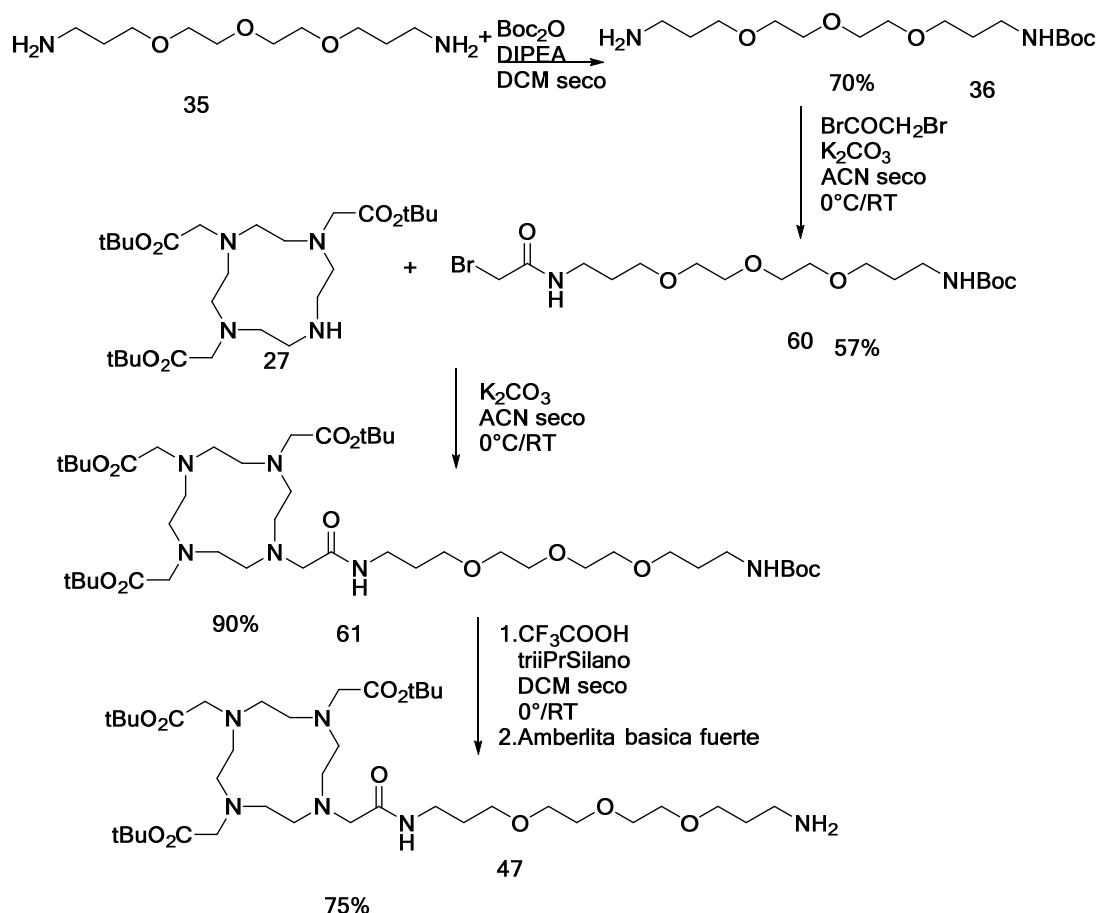
Se opta entonces por introducir un espaciador entre los anillos aromáticos y el tetraazamacrociclo para solventar el problema del impedimento estérico a la hora de la alquilación, que tiene lugar con los ácidos de DOTAm protegidos como ésteres *tert*-butilicos. El espaciador escogido ha sido en este caso también 4,7,10-trioxadodecan diamina (35), cuyo nombre trivial es diamino peg.

Como en el caso del derivado de ácido pirenilbutírico en el cual se ha empleado el diamino peg, aquí también es necesario un paso previo de protección de una de las unidades amínicas presentes como carbamato de *tert*-butilo. La reacción de protección, como se ha comentado anteriormente tiene lugar con un rendimiento de 70%. El paso sucesivo ha requerido la puesta a punto de las mejores condiciones.

En el Esquema Sintético 22 solo se muestran las condiciones que han dado mejor resultado, proporcionando 60 con un rendimiento de 57%. Antes de conseguir este resultado se había llevado a cabo la reacción en presencia de DIPEA en ACN a  $0^\circ\text{C}$  pero no se había obtenido el producto de acilación.

El paso sucesivo es la alquilación del éster *tert*-butilico de DO3A (27) con el derivado 60, que en presencia de carbonato potásico en ACN

proporciona el compuesto **61** con un rendimiento de 90%. Cabe destacar que también en este caso que la amina libre de DO3A se ha liberado de la forma de hidrobromuro de amonio por precipitación de hidrobromuro de amonio por tratamiento con amoníaco gaseoso.



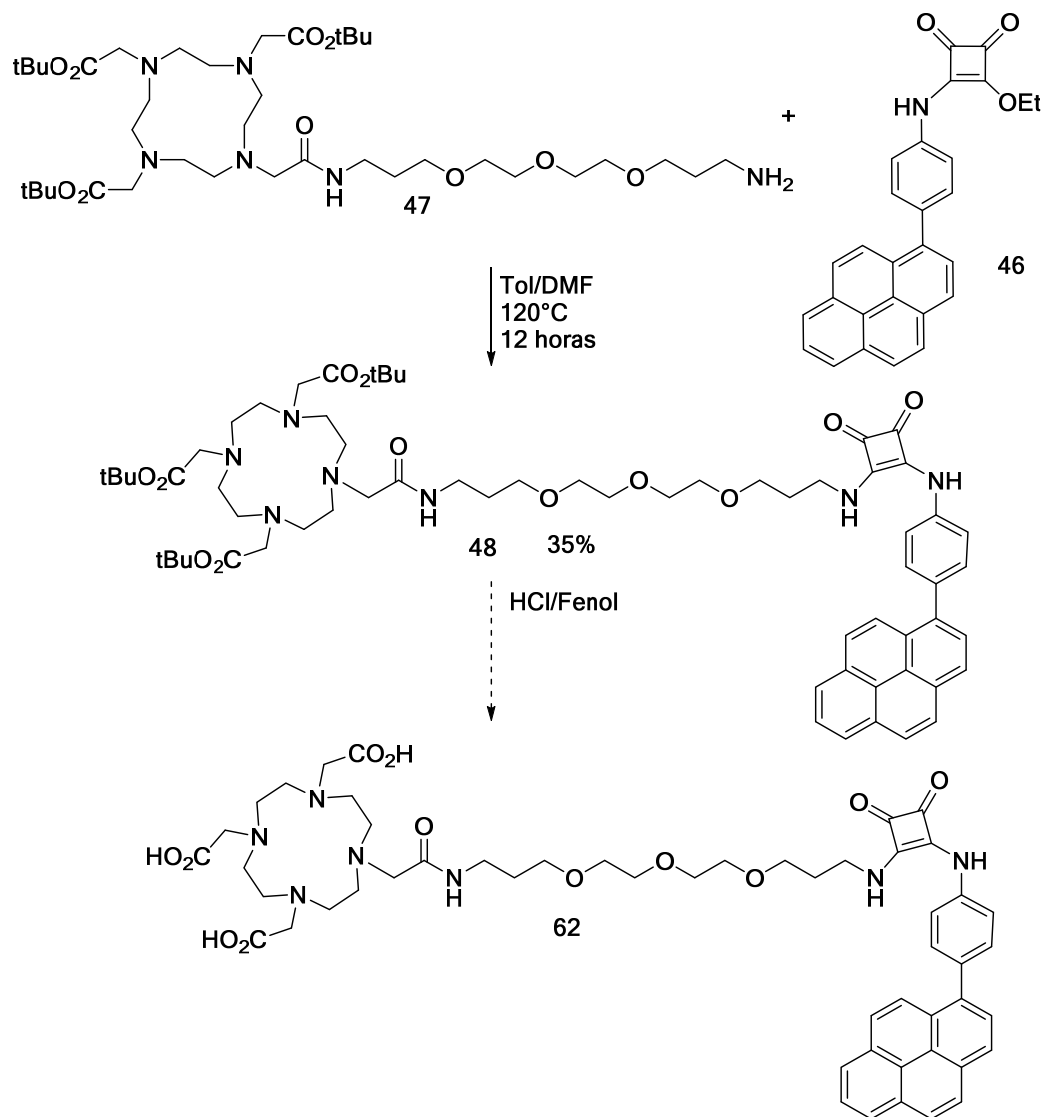
**Esquema Sintético 22.** Síntesis de 2,2',2''-(10-(16-amino-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azaexadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil) triacetato de tri-*terc*-butilo (DOTAmaPegNH<sub>2</sub>, **47**)

Se ha llevado a cabo la hidrólisis del grupo protector Boc en presencia de TFA en DCM, y triisopropilsilano, manteniendo inalterados los ésteres *terc*-Butilicos presentes. Para liberar la amina de la sal de trifluoroacetato se ha tratado el crudo de reacción con una resina de intercambio iónico: Amberlita IRA400 básica fuerte. Tras la hidrólisis y la purificación se obtiene el compuesto **47** con un rendimiento de 75%.

La ruta sintética seguida ha dado lugar a un rendimiento global de 27%.

#### 4.4.3.4. Alquilación entre el derivado de Suzuki y el derivado de DOTAmPegNH<sub>2</sub>

Finalmente se alquila el compuesto 47 con el compuesto 46 en presencia de di-triflato de cinc como ácido de Lewis en tolueno y DMF a 120 °C durante 12 horas, y se obtiene el producto 48 con un rendimiento del 35% (Esquema Sintético 23).



Esquema Sintético 23. Obtención derivado de Suzuki-DOTAmPegPireno.

La reacción de hidrólisis de los ésteres *terc*-butílicos del compuesto 48 se lleva a cabo en condiciones ya experimentadas de ácido clorhídrico en fenol y, como en todos los casos, se sigue la reacción por HPLC-MS: en el crudo

se observa un pico cuya masa es 977.1 Da que corresponde a la masa del producto **62**. Tras la extracción líquido-líquido en agua/éter dietílico necesaria a la eliminación de fenol, se vuelve a analizar en HPLC-MS las dos fases y en ninguna se vuelve a observar el pico correspondiente a la masa del producto **62**.

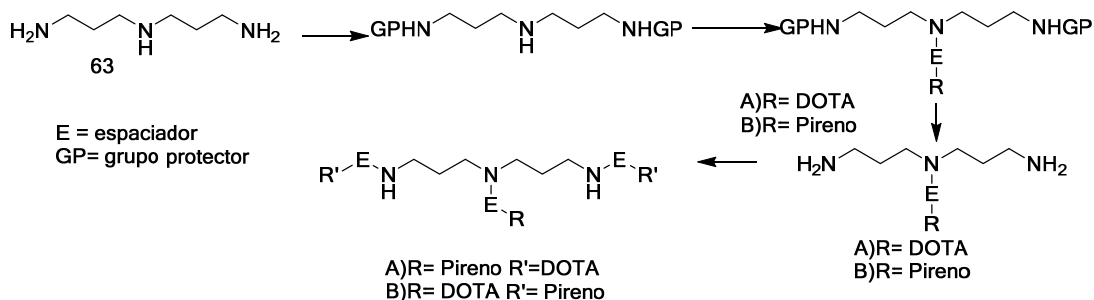
Se ha diseñado y sintetizado un posible ligando que además de un anillo pirénico lleva en su estructura un fenilo para aumentar la superficie de las interacciones  $\pi-\pi$ . No se ha podido obtener el complejo de Gd(III).

#### 4.4.4. Derivados con dos complejos de Gd(III)

Como se ha comentado en el apartado 4.4 se planifica la síntesis de un compuesto que lleve en su estructura además de una unidad de pireno, dos unidades de complejo de Gd(III) con el fin de incrementar la relajatividad del sistema. Se presentan a continuación las dos rutas sintéticas seguidas para la obtención del compuesto de tales características.

##### 4.4.4.1. Derivado de bispropilentriamina

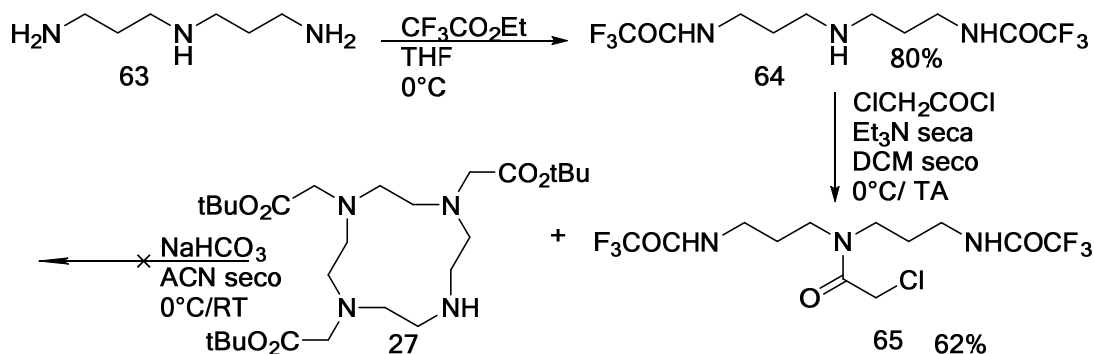
En un primer momento se elige como esqueleto del compuesto  $N^1$ -(3-aminopropil)propan-1,3-diamina (bispropiletriamina, **63**) y se proponen dos derivados. Un primero, que lleve en el nitrógeno secundario la jaula de coordinación para el gadolinio y en los nitrógenos terminales dos unidades de pireno, y otro, con la unidad de pireno en el nitrógeno central y los complejos de gadolinio en los nitrógenos terminales. En ambos casos, la ruta sintética necesitaría en primer lugar la protección de los nitrógenos terminales, seguida de la alquilación o condensación del nitrógeno secundario, la desprotección de los grupos protectores, la funcionalización bien con los derivados de pireno en un caso o con DOTA etilendiamina en el segundo caso, y finalmente, la desprotección de los ésteres terc-butilicos de DOTAm, para poder obtener el complejo de gadolinio correspondiente según el esquema sintético indicado a continuación.



**Esquema Sintético 24.** Ruta sintética para la obtención del derivado de bispropilentriamina

### Grupo protector: trifluoroacetamidas

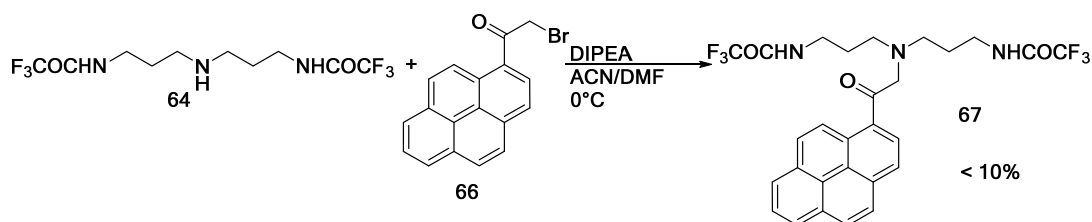
En primer lugar se escogió como grupo protector trifluoroacetamida, por reacción de bispropilentriamina con trifluoroacetato de etilo en THF a 0 °C que dio lugar al producto protegido 64 con un rendimiento del 80%. Seguidamente se aciló el nitrógeno central con cloruro de cloroacetilo en presencia de TEA como base y DCM como disolvente y se obtuvo 65 con un rendimiento del 62%. La reacción de alquilación del éster *tert*-butílico de DO3A 27 con el producto 65 no dio lugar al producto esperado, ya que al HPLC-MS se encontraron solo los picos relativos a los productos de partida. Se piensa que haya podido ocurrir por dos razones: por impedimento estérico o por la acidez de las trifluoroacetamidas.



**Esquema Sintético 25.** Ruta sintética propuesta para la obtención del derivado con bistrifluoroacetamida y dos unidades de pireno.

Se decide intentar alquilar el compuesto 64 con bromo acetil pireno (66), en presencia de DIPEA como base y una mezcla de ACN/DMF secos para obtener el derivado con dos unidades de complejo de gadolinio, según el esquema sintético a continuación (Esquema Sintético 26). En este caso se

obtiene el producto de alquilación **67** con rendimientos inferiores al 10%, se decide por lo tanto buscar otro grupo protector para las aminas terminales.



**Esquema Sintético 26.** Alquilación bispropiletri-*tert*-butoxycarbamato con bromoacetilpireno.

### Grupo Protector: Boc

Se elige proteger las aminas terminales como carbamatos de *tert*-butoxicarbonilo (grupo protector Boc), y se lleva a cabo la protección en diferentes condiciones (Tabla 4.16) hasta alcanzar buenos rendimientos.

**Tabla 4.16.** Condiciones de reacción empleadas para la obtención de bispropiletri-*tert*-butoxycarbamato diBoc

Reactivo	Base	Disolvente	Temperatura	Atmósfera	Rendimiento Bis Protegido
Boc <sub>2</sub> O	DIPEA	DCM seco	0°- TA	Ar	10%
Boc <sub>2</sub> O	DIPEA	DCM seco	-20°- TA	Ar	14%
Boc <sub>2</sub> O	NaOH	tBuOH/H <sub>2</sub> O	TA	Aire	solo triprotegido
tBuOH/CDI	KOH	Tol seco	TA	Ar	n.r.
PhOCOCTBu		DMF	25 °C	Ar	69.6%

n.r. = no reacciona

En primer lugar se llevó a cabo la reacción empleando carbonato de *di-tert*-butilo en presencia de DIPEA como base en DCM a 0 °C durante 24 horas, pero la reacción dio lugar a una mezcla de productos mono, bis y tris-protegidos, con un rendimiento de tan solo el 10%. Se decidió bajar la temperatura a -20 °C, pero el rendimiento alcanzó solo el 14%.

Se empleó carbonato de *di-tert*-butilo con sosa en mezcla de *tert*-butanol y agua y solo se obtuvo producto triprotegido.



Se llevó a cabo la reacción empleando las condiciones de Rannard et al,<sup>205</sup> que emplean carbonildiimidazol y *tert*-ButOH para formar un intermedio que será la especie reactiva en la formación del carbamato en presencia de hidróxido de potasio como base y tolueno como disolvente, pero en este caso tampoco se obtuvo producto bisprotegido.

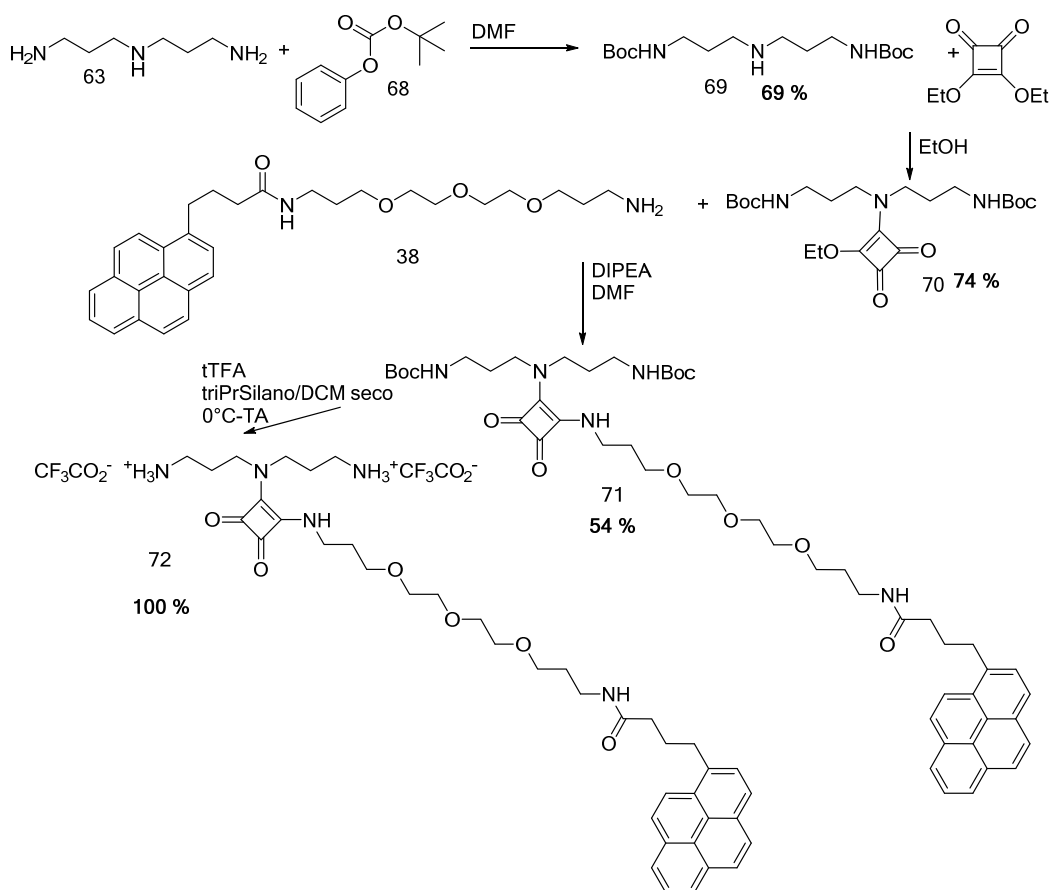
Finalmente se siguieron las condiciones de Ghatnekar y colaboradores<sup>206</sup> que usan aril alquil carbonatos en la formación de carbamatos con aminas primarias. En concreto, la reacción de bispropilentriamina (63) con carbonato de fenil *tert*-butilo (68) en DMF bajo atmósfera de Argón originó el producto deseado (69) con un rendimiento del 69%.

Tras obtener el producto bisprotegido (69) se sigue la ruta sintética (Esquema Sintético 27) con la alquilación del nitrógeno central con escuarato de dietilo en etanol dando lugar al producto alquilado 70 con un rendimiento del 74%. La posterior reacción con 38 da lugar, en presencia de DIPEA seca como base, al producto 71 con un rendimiento del 54%. La hidrólisis de los carbamatos de di *tert*-butilo en las condiciones habituales de ácido trifluoroacético en diclorometano seco y con isopropilsilano como “scavenger” da lugar al producto 72 con rendimientos cuantitativos. Se intenta purificar con Amberlita básica fuerte para liberar la amina de la forma de trifluoroacetato de amonio pero la presencia de NaOH 2N acuosa hidroliza el enlace *N*-escuarato fragmentando la estructura del compuesto 72. Hasta este paso el rendimiento global es de 27.5%.

---

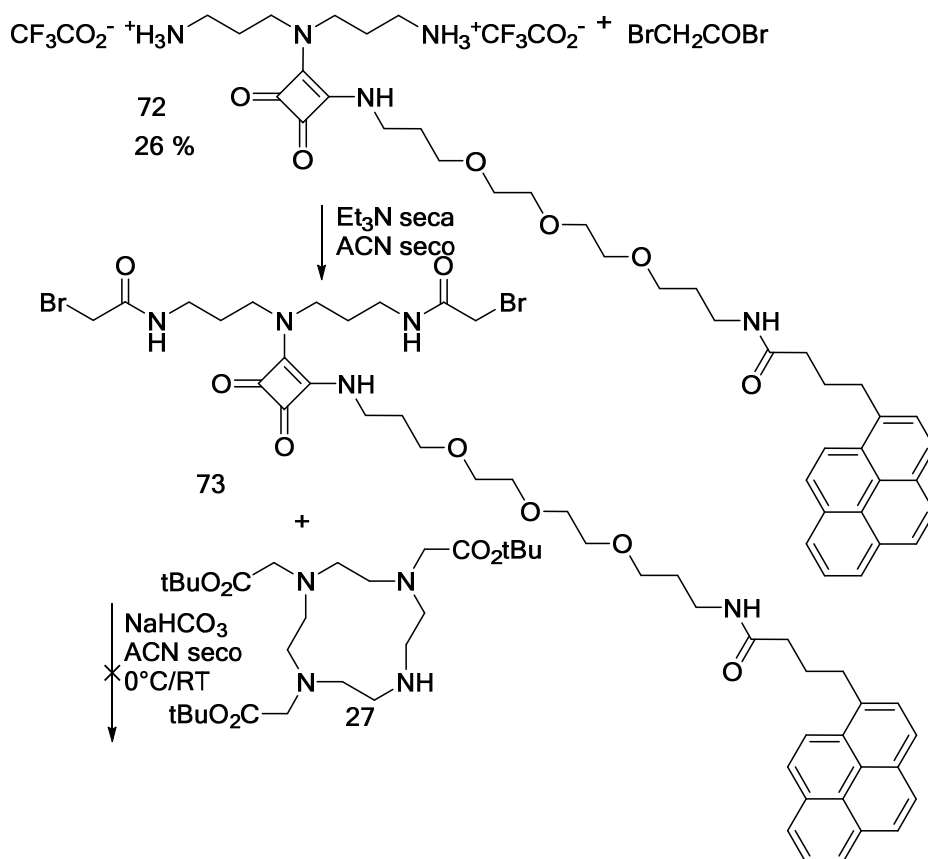
<sup>205</sup> Rannard, S. P.; Davis, N. J. The selective reaction of primary amines with carbonyl imidazole containing compounds: Selective amide and carbamate synthesis. *Organic Letters* **2000**, 2(14), 2117-2120.

<sup>206</sup> Ghatnekar, J.; Hagerlof, M.; Oredsson, S.; Alm, K.; Elmroth, S. K.; Persson, T. Construction of polyamine-modified uridine and adenosine derivatives - evaluation of DNA binding capacity and cytotoxicity in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, 15(23), 7426-7433.



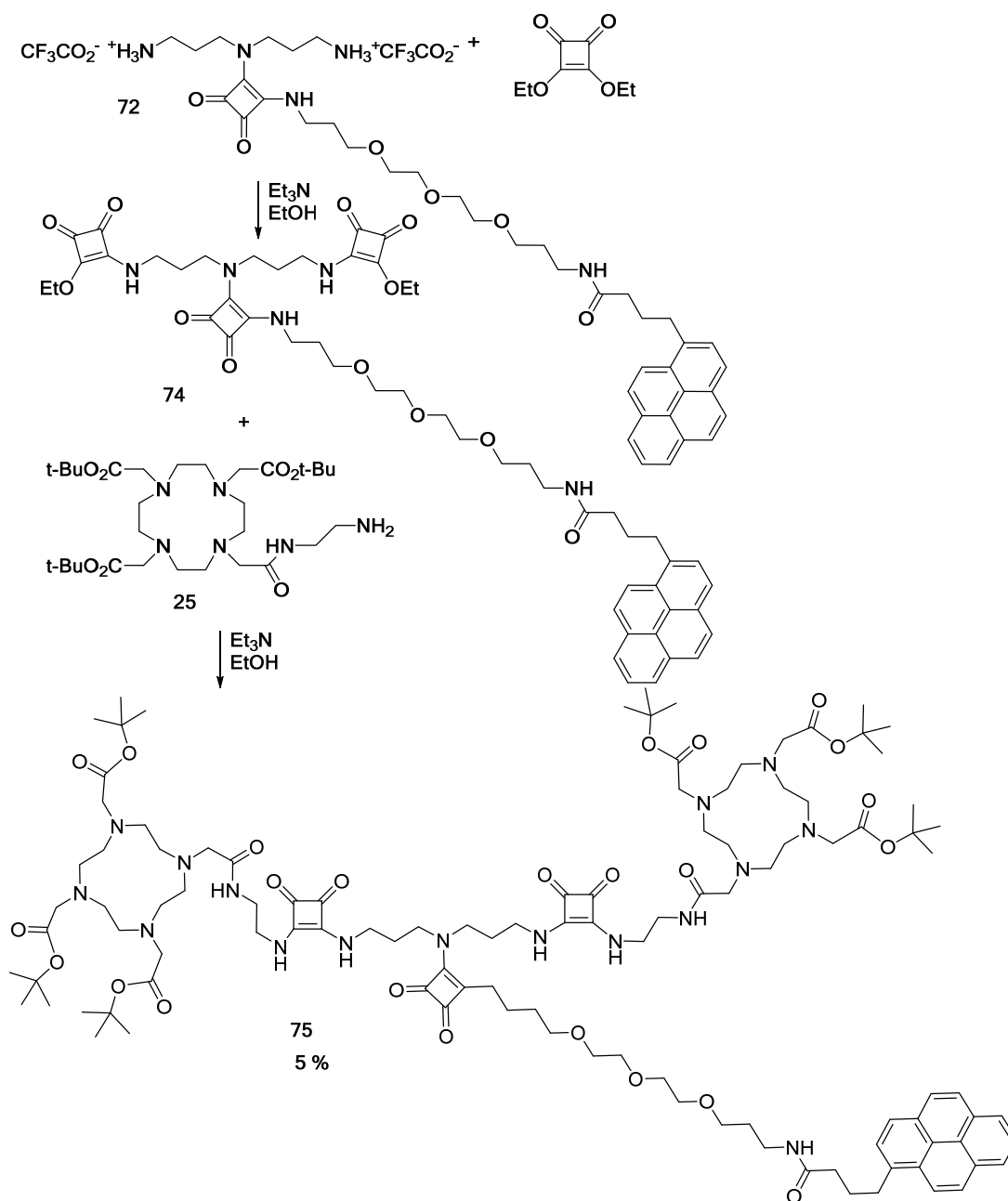
### Esquema Sintético 27. Ruta sintética para la obtención del compuesto 72

El paso siguiente es la acilación de los nitrógenos terminales con bromuro de bromoacetilo con TEA seca y ACN seco que da lugar al producto 73 con un rendimiento del 26%. Posteriormente se alquila el éster *terc*-butilíco de DO3A (27) empleando carbonato potásico como base en ACN seco con el producto 73 pero no se obtiene el producto de alquilación, tan solo se observan en HPLC-MS, los picos relativos a los productos de partida, según el Esquema Sintético 28.



Esquema Sintético 28.

Debido al fracaso de la ruta sintética anterior se propone la alquilación del producto 72 con escuarato de dietilo con TEA seca y etanol que da lugar al producto de alquilación 74 con un rendimiento del 20%. Posteriormente se alquila DOTAetilendiamina 25 en presencia de TEA seca en etanol, tras una purificación por Sephadex LH20 y por cromatografía sobre gel de sílice se obtiene el producto de alquilación 75 con tan solo el 5% de rendimiento. El rendimiento global de la reacción es de 1.14%.



Esquema Sintético 29 Ruta sintética para la obtención de 75

Debido al bajísimo rendimiento y a la complejidad de la ruta sintética seguida se propone otro esqueleto que proporcione un compuesto con dos unidades de complejo de Gd (III) en menos pasos de reacción.

#### 4.4.4.2. Derivado de TREN (*N'*,*N'*-bis(2-aminoetil)etan-1,2-diamina)

Se elige como esqueleto del compuesto que lleve dos unidades de complejo de Gd(III) *N'*,*N'*-bis(2-aminoetil)etan-1,2-diamina (**76**), de ahora en adelante TREN, ya que en bibliografía se encuentran diferentes ejemplos<sup>9,207,208</sup> de empleo de esta molécula con los mismos fines propuestos en este trabajo.

El primer paso de la síntesis de este derivado consiste en la alquilación de TREN con escuarato de dietilo. Se llevan a cabo las reacciones con diferentes equivalentes de escuarato de dietilo para obtener el producto de alquilación según la **Tabla 4.17**.

**Tabla 4.17.** Estequiometría empleada en la alquilación de TREN con escuarato de etilo

Equivalentes TREN	Equivalentes Escuarato de dietilo	Rendimiento
2	1	---
1	1	---
1	2	---
1	5	---
1	10	73%

Solamente en condiciones de largo exceso, 10 equivalentes molares de escuarato de dietilo por mol de TREN, se obtiene el producto trialquilado **77**.

Tras la alquilación de TREN (**77**) se procede con la alquilación de PegPireno **38** que en presencia de TEA seca en EtOH da lugar al producto **78**, con un rendimiento de 18%. La purificación del compuesto **78** ha sido muy tediosa ya que inicialmente se purificaba por cromatografía sobre gel de sílice, técnica que se ha tenido que abandonar ya que provocaba la ruptura de la molécula: en TLC se observaba la mancha relativa al producto **78**, confirmada en HPLC-MS, pero tras la elución en condiciones en

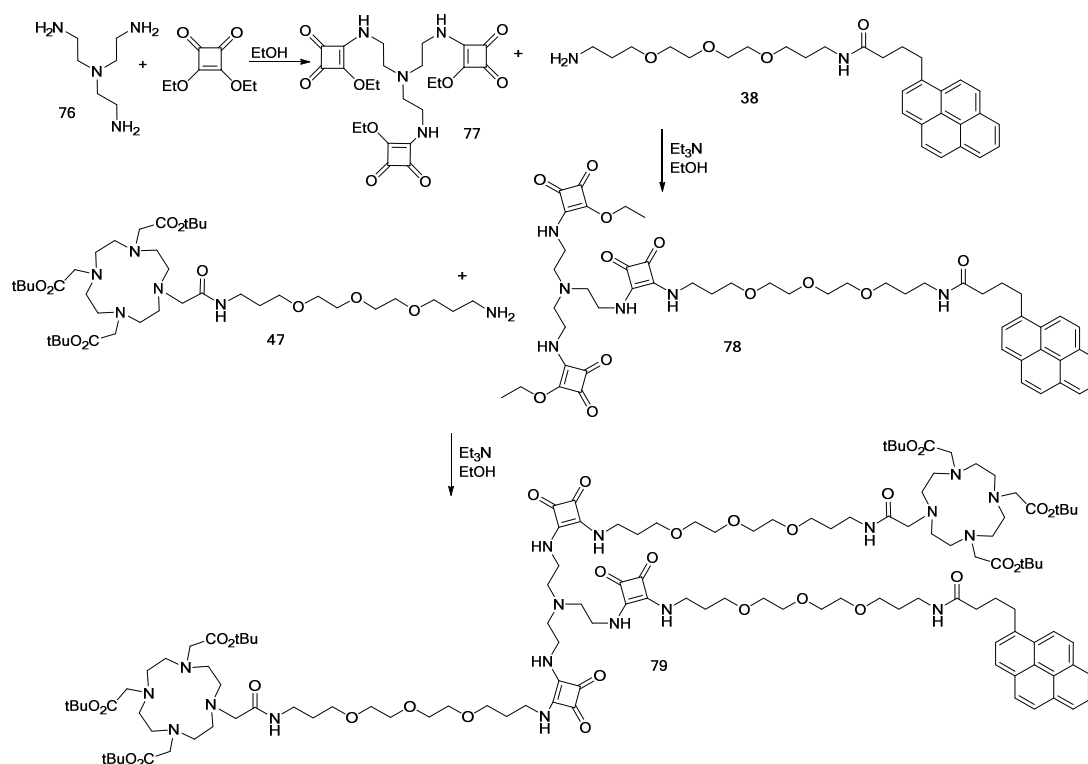
<sup>9</sup> Tei, L.; Barge, A.; Crich, S. G.; Pagliarin, R.; Negri, V.; Ramella, D.; Cravotto, G.; Aime, S. Target Visualization by MRI Using the Avidin/Biotin Amplification Route: Synthesis and Testing of a Biotin-Gd-DOTA Monoamide Trimer. *Chemistry-A European Journal* **2010**, *16* (27), 8080-8087.

<sup>207</sup> Davis, B. G. The controlled glycosylation of a protein with a bivalent glycan: towards a new class of glycoconjugates, glycodendriproteins. *Chem. Commun.* **2001**, (4), 351-352.

<sup>208</sup> Sasaki, Y.; Shukla, R.; Smith, B. D. Facilitated phosphatidylserine flip-flop across vesicle and cell membranes using urea-derived synthetic translocases. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, *2* (2), 214-219.

gradiente de polaridad con mezcla DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH no se observaba ni en TLC ni en HPLC-MS. Por esta razón se decide purificar el crudo de reacción por cromatografía de exclusión molecular empleando Sephadex LH20, ya que el producto **78** es el de más peso en el crudo de reacción. El rendimiento del 18% se calcula tras dos cromatografías consecutivas.

La reacción de alquilación entre DOTAmaEtilendiaminaPegNH<sub>2</sub> (**47**) y **78** tiene lugar empleando TEA seca como base en etanol y proporciona **79** con un rendimiento de 37% (**Esquema Sintético 30**). Esta ruta sintética en comparación con la propuesta empleando bispropilentriamina requiere menos pasos y tiene lugar con un rendimiento global de 4.8%, que sigue siendo bastante bajo.



**Esquema Sintético 30.** Ruta sintética para la obtención del derivado de TREN

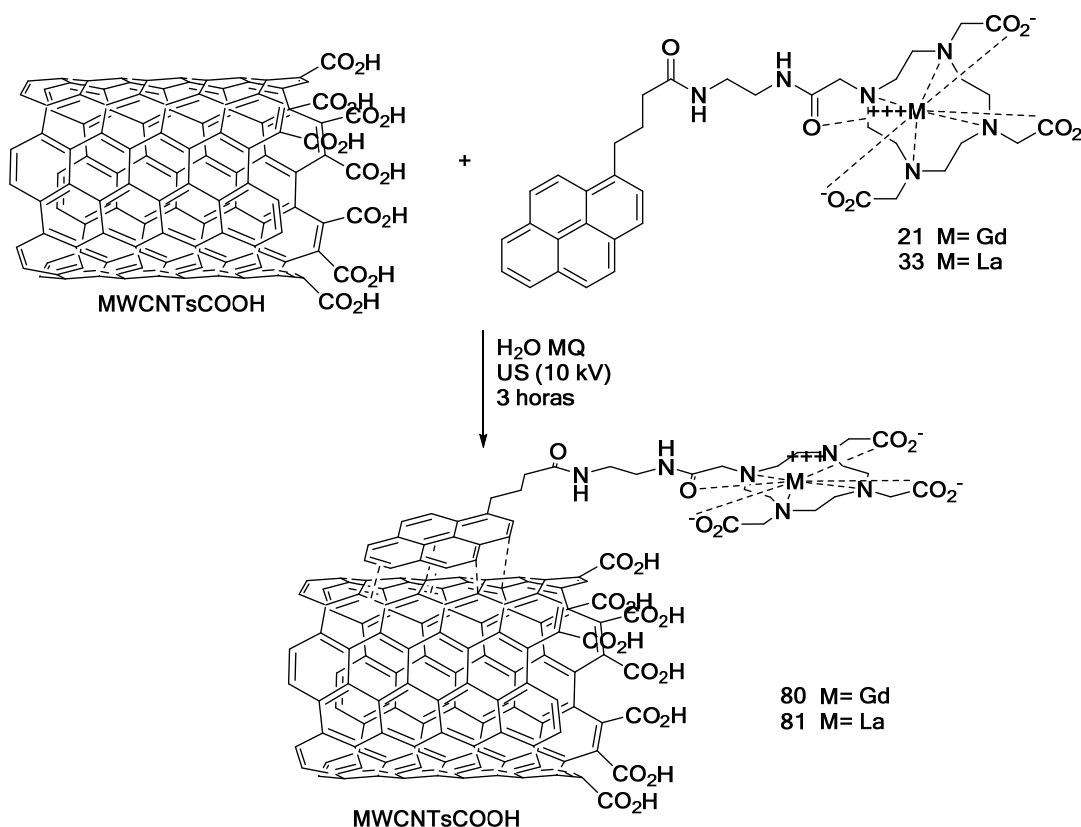
Se han diseñado dos rutas sintética para la obtención de un ligando que llevase en su estructura dos unidades de complejo de Gd(III) además que una unidad de pireno. La primera ruta sintética ha sido muy larga y no ha llevado a la obtención de un ligando final. En el segundo caso, con el

derivado de TREN se ha obtenido el ligando hasta antes de la hidrolisis de los ésteres *terc*-butílicos presentes.

## 4.5. FORMACIÓN ADUCTOS POR INTERACCIONES $\pi-\pi$

### 4.5.1. Aductos por interacciones $\pi-\pi$ entre MWCNTsCOOH y DOTAmaEtilendiaminaPireno

La formación de los aductos por interacciones  $\pi-\pi$  entre los nanotubos oxidados y los complejos de Gd(III)DOTAmaEtilendiamina 21 y el complejo de La(III) DOTAmaEtilendiamina 33 se lleva a cabo en agua MILLI-Q con ultrasonidos (potencia de salida 10 kV) para favorecer la solubilidad de los nanotubos, empleando 3 equivalentes de complejo de Gd(III) o 2 equivalentes de complejo de La(III) con respecto a los nanotubos oxidados (Esquema Sintético 31).



**Esquema Sintético 31.** Formación aductos por interacciones  $\pi-\pi$  entre nanotubos oxidados y complejos derivados de DOTAmaEtilendiaminaPireno.

El análisis termogravimétrico en Argón del aducto obtenido muestra una mayor funcionalización de la muestra con respecto a los nanotubos oxidados ya que se observa una pérdida de 5.7% antes de 300 °C, seguida



de una pérdida en peso de 15% entre los 300 y 550 °C, atribuible a la funcionalización de los nanotubos con el complejo. El residuo en Argón a 980°C es de 69.2%.

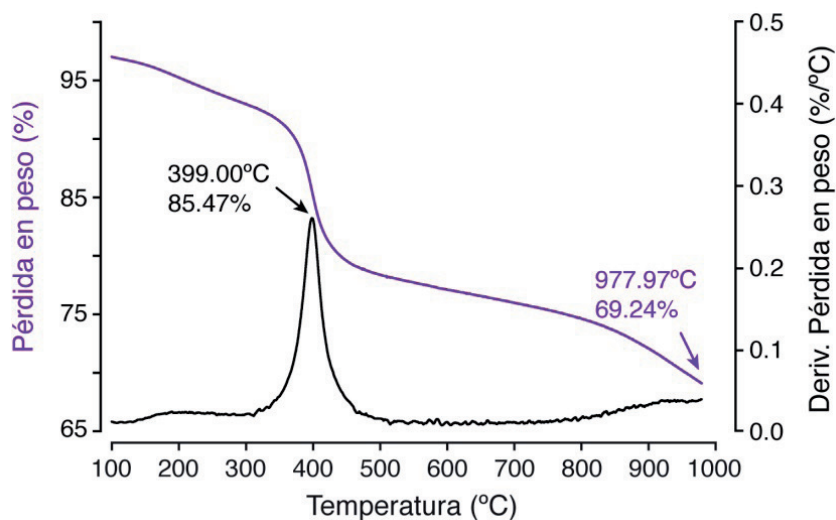


Figura 4.54. TGA del aducto 80 en Argón.

El TGA en aire del aducto 80 muestra tres pérdidas en peso significativas, evidenciadas también por la derivada de la pérdida en peso. La primera pérdida, a 320 °C (17.95%) es atribuible a los carboxilatos del complejo y de los nanotubos. La segunda, a 406 °C (21.3%) es debida a las demás funcionalizaciones, y la tercera y más significativa a 486 °C (49.8%), atribuible a los MWCNTs. El residuo a 972 °C es de 10.13 %.

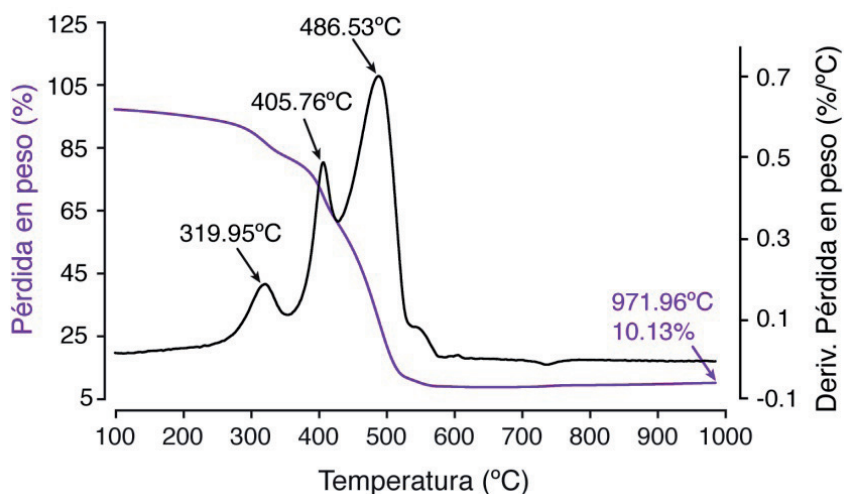


Figura 4.55 TGA del aducto 80 en aire

El espectro infrarrojo del aducto **80** (Figura 4.56) refleja los picos característicos del complejo **21** (en rosa) y de los MWCNTsCOOH (en azul): la banda ancha a  $3281\text{ cm}^{-1}$  pertenece a la tensión del O<sup>-</sup> de los carboxilatos y  $3212\text{ cm}^{-1}$  a la tensión N-H, los picos a  $2874$  y  $2826\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen a la tensión C-H de las amidas presentes en el complejo, a  $1715\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la tensión del C=O del carbonilo del ácido carboxílico, mientras que a  $1648\text{ cm}^{-1}$  la tensión del C=O del carbonilo de las amidas secundarias, este pico se solapa con el pico a  $1578$  y  $1553\text{ cm}^{-1}$  la banda de las amidas secundarias y con el pico a  $1540\text{ cm}^{-1}$  debido a C=C del esqueleto de los nanotubos. Otro pico a destacar ocurre a  $1430\text{ cm}^{-1}$ , por la tensión C-N.

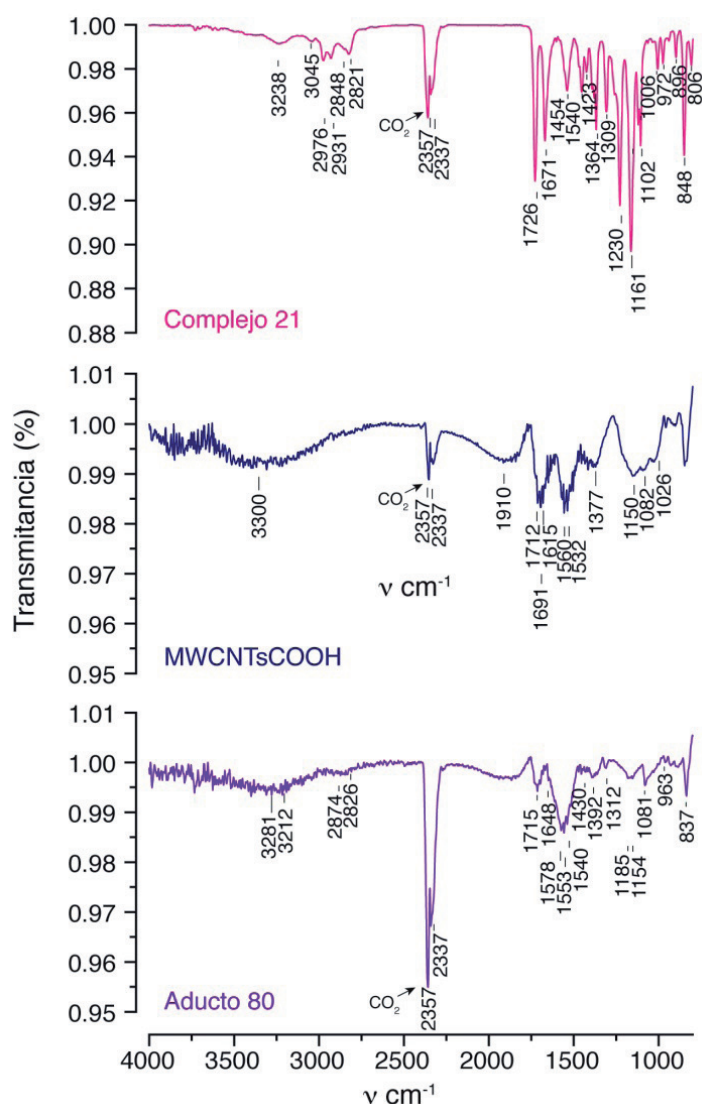
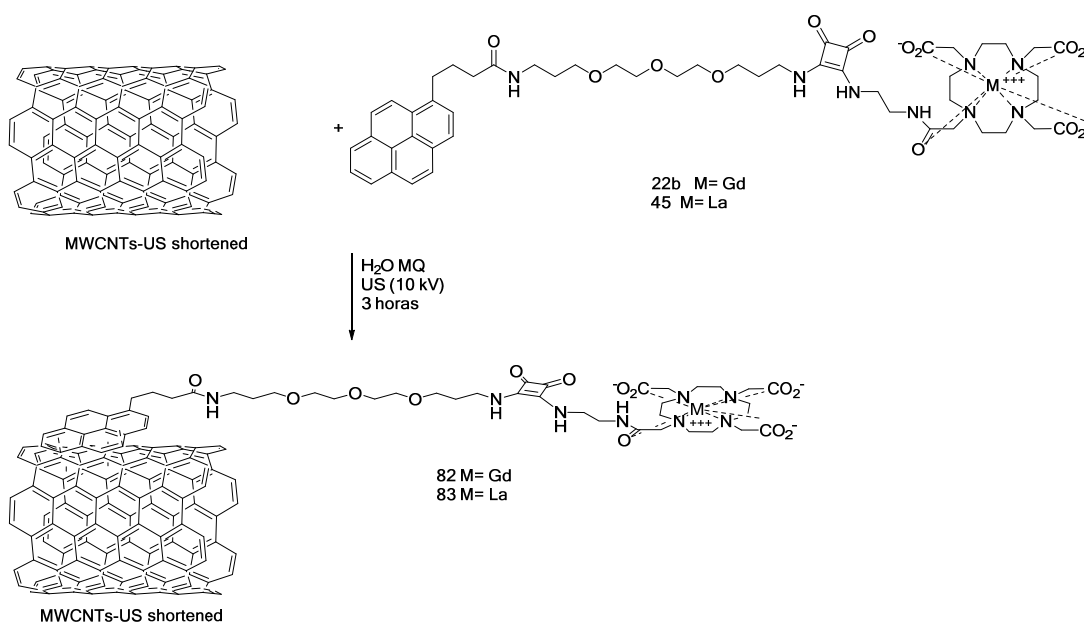


Figura 4.56. Espectro FT-IR (ATR Ge) del complejo **21**, MWCNTsCOOH y aducto **80**.

Los picos por debajo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  pertenecen a la huella dactilar de los nanotubos.

#### 4.5.2. Aductos por interacciones $\pi-\pi$ entre MWCNTs-US y DOTAmaPegPireno

La formación de los aductos por interacciones  $\pi-\pi$  entre los nanotubos fragmentados por ultrasonidos (MWCNTs-US) y los complejos de Gd(III) DOTAmaPegPireno **22b** y el complejo de La(III) DOTAmaPegPireno **45** se lleva a cabo en agua Milli-Q con ultrasonidos (potencia de salida 10 kV) para favorecer la solubilidad de los nanotubos, empleando 2.5 equivalentes de complejo de Gd y 2 equivalentes de complejo de La con respecto a los nanotubos fragmentados por ultrasonidos (**Esquema Sintético 32**).



**Esquema Sintético 32.** Formación aductos por interacciones  $\pi-\pi$  entre nanotubos fragmentados por ultrasonidos y complejos derivados de DOTAmaPegPireno.

El análisis termogravimétrico en Argón del aducto **82** (**Figura 4.57**), como para el aducto **80**, muestra una elevada funcionalización de la muestra ya que se observan diferentes pérdidas en peso antes de los  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a  $346\text{ }^{\circ}\text{C}$  debidas a los carboxilatos y a  $381\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con pérdida en peso de 39% que se atribuyen a la descomposición de los complejos presentes en la superficie de los nanotubos, el residuo a  $981\text{ }^{\circ}\text{C}$  es de 36.26%.

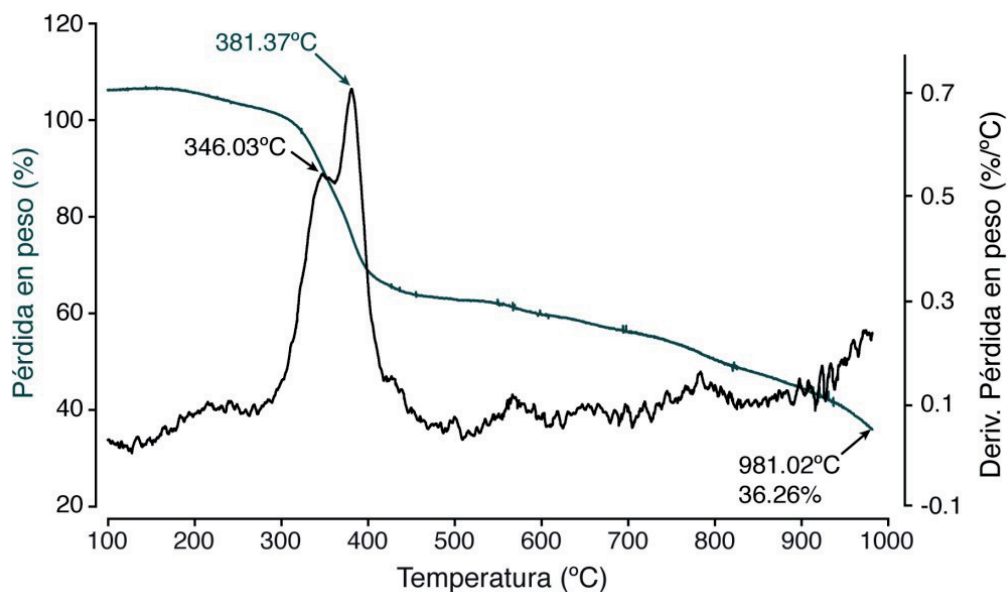
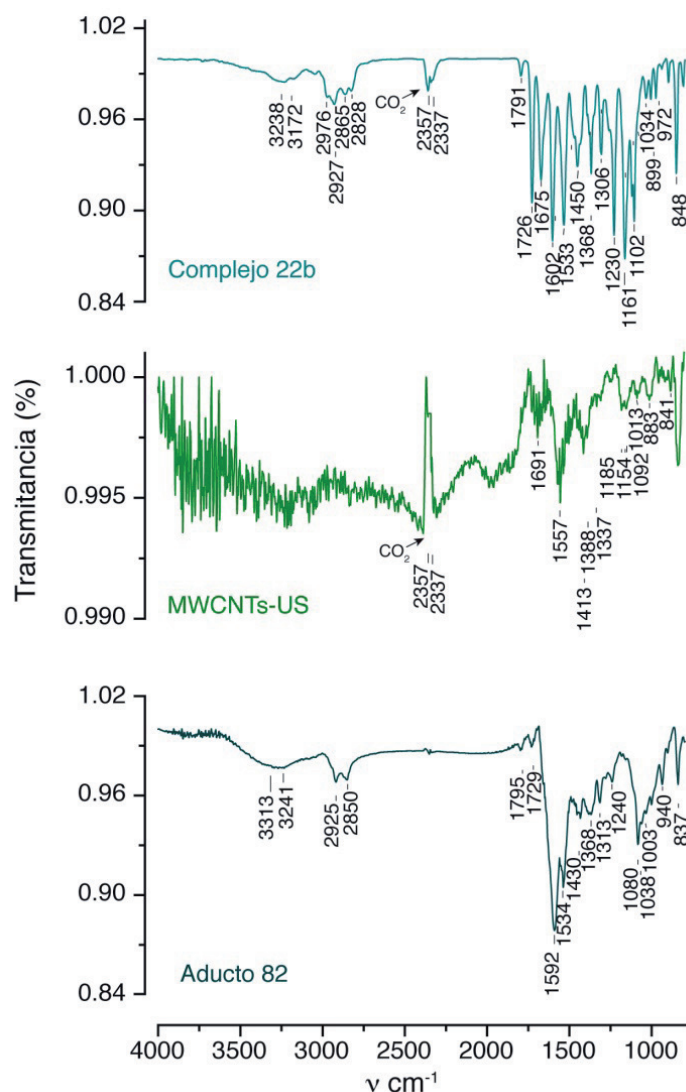


Figura 4.57. TGA del aducto **82** en Argón

El espectro infrarrojo del aducto **82** (Figura 4.58) refleja los picos característicos del complejo **22B** y de los MWCNTs. A  $3313\text{ cm}^{-1}$  se observa la tensión del O<sup>-</sup> de los carboxilatos y a  $3214\text{ cm}^{-1}$  la tensión N-H. Los picos a  $2925$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen a la tensión C-H de las amidas presentes en el complejo. A  $1729\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la tensión del C=O del carbonilo del ácido carboxílico, mientras que a  $1592\text{ cm}^{-1}$  la tensión del C=O del carbonilo de las amidas secundarias, este pico se solapa con el pico a  $1534\text{ cm}^{-1}$  debido a C=C del esqueleto de los nanotubos y la segunda banda de las amidas. Otro pico a destacar ocurre a  $1430\text{ cm}^{-1}$ , debido a la tensión C-N. Los picos por debajo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  pertenecen a la huella dactilar de los nanotubos.



**Figura 4.58.** Espectros FT-IR (ATR Ge) de complejo **22b**, MWCNTs y Aducto **82**.

Los aductos se caracterizan adicionalmente a las técnicas descritas en este apartado, con los mismos métodos empleados anteriormente con los nanotubos. En particular, se realizan experimentos de fluorescencia, se estudian las propiedades relaxométricas de los complejos, de los aductos y de los nanotubos solos; se registran Mapas de  $T_1$  y de  $T_2$  de los diferentes sistemas y se estudia la difusión del agua con mapas de coeficiente de difusión aparente del agua por MRI. Los resultados se describirán con los aductos obtenidos con MWCNTs fragmentados por ultrasonidos y Gd(III) o La (III) DOTAmPegPireno (**22b** y **45**) para mayor comprensión y para poder

realizar una discusión comparativa de los dos aductos por interacciones  $\pi-\pi$ .

## 4.6. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS LIGANDOS, COMPLEJOS Y ADUCTOS OBTENIDOS

### 4.6.1. Fluorescencia

Los sistemas sintetizados llevan en su estructura un fluoróforo conocido: el pireno, del cual se han descrito sus características en el apartado 2.5. Debido a la presencia de este fluoróforo se considera la posibilidad de emplear los aductos obtenidos como sondas multimodales bivalentes: para MRI y para fluorescencia. Con este fin se realizan unos estudios preliminares de fluorescencia donde se comparan los aductos 80 y 81 obtenidos, los complejos 21 y 22b además de los complejos de La(III), los aductos correspondientes y los relativos ligandos. Los experimentos se llevan a cabo a pH = 7.2 ( $\pm 0.3$ ) a 25 °C, en los espectros de emisión la longitud de onda de excitación está fijada a 340 nm, mientras que en los de excitación la longitud de onda de emisión es de 370 nm.

Ambas familias de derivados dan lugar a espectros de emisión de fluorescencia con picos estructurados, típicos de pireno con ausencia del pico del excímero. A continuación se presentan primero los estudios relativos a DOTAmEtilendiaminaPireno seguidos de los de DOTAmPegPireno y se concluye con un estudio comparativo. En todos los casos se muestran los espectros normalizados con respecto al pico  $I_3^{209}$  (383 nm) para poder efectuar una comparación cualitativa de las diferentes muestras ya que no presentan la misma concentración.

---

<sup>209</sup> Ray, G. B.; Chakraborty, I.; Moulik, S. P. Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, 294 (1), 248-254.

#### 4.6.1.1. Fluorescencia DOTAmaEtilendiaminaPireno

Se han analizado todos los derivados de DOTAmaEtilendiaminaPireno empezando por el ácido libre (32), los complejos de Gd (III) (21) y de La (III) (33) y los aductos entre los nanotubos oxidados y los complejos de Gd (aducto 80) y de La (aducto 81), a concentraciones diferentes, como se muestra en la Tabla 4.18. Las concentraciones se expresan bien en mM como en mg/mL para poder comparar los complejos con los aductos, ya que su peso molecular es desconocido.

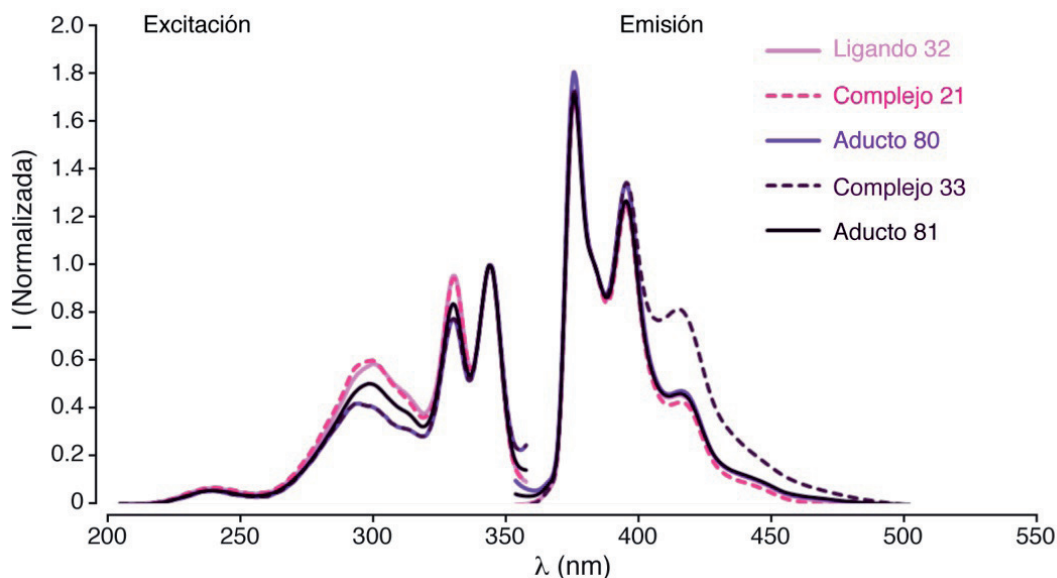
**Tabla 4.18.** Concentración de las muestras empleadas en la caracterización por fluorescencia de los derivados de DOTAmaEtilendiaminaPireno

Compuestos	mM	mg/mL
Ligando 32 Ácido libre	$2.5 \cdot 10^{-9}$	$7.8 \cdot 10^{-10}$
Complejo 21 de Gd (III)	$10^{-7}$	$3.48 \cdot 10^{-8}$
Complejo 33 de La (III)	$7.33 \cdot 10^{-8}$	$2.49 \cdot 10^{-8}$
Aducto 80 MWCNTs-COOH y complejo 21 de Gd (III)		$5 \cdot 10^{-4}$
Aducto 81 MWCNTs-COOH y complejo 16 de La (III).		$5 \cdot 10^{-4}$

Los aductos, ya que contienen menos unidades de pireno que los otros derivados, tienen mayor concentración, alcanzando los  $10^{-4}$  mg/mL.

Los espectros de excitación y de emisión de fluorescencia se muestran en la Figura 4.59. Los espectros de excitación son especulares a los de emisión que en todos los derivados muestran tres máximos a 375, 395 y 415 nm, típicos de la emisión de pireno como monómero, en particular el complejo de La (III) muestra el pico a 415 nm más intenso que en los otros derivados.





**Figura 4.59.** Espectros de excitación, ( $\lambda_{em} = 370$  nm), normalizado vs  $\lambda_N = 343$  nm y de emisión de fluorescencia, ( $\lambda_{ex} = 340$  nm) normalizado vs  $\lambda_N = 383$  nm de los derivados de DOTAmEtilediaminaPireno.

Lo que cabe destacar es la relación entre los picos  $I_1$  a 375 nm e  $I_3$  a 383 nm parámetro empleado para proporcionar información acerca del entorno del fluoróforo (Tabla 4.19), como ya se ha descrito en el Apartado 2.5.<sup>210,152</sup> Cuanto mayor es la relación, mayor será la polaridad del entorno, siendo 1.8 - 1.9 en agua y bajando a 0.6 en ambiente apolar.<sup>150,151</sup> En todos los compuestos analizados se observa un entorno polar del fluoróforo.

<sup>210</sup> Li, M.; Jiang, M.; Zhang, Y. X.; Fang, Q. Fluorescence studies of hydrophobic association of fluorocarbon-modified poly(N-isopropylacrylamide). *Macromolecules* **1997**, *30* (3), 470-478.

<sup>152</sup> Paeng, K. W.; Kim, B. S.; Kim, E. R.; Sohn, D. Aggregation processes of hydrophobically modified polyethylene oxide. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2000**, *21* (6), 623-627.

<sup>150</sup> Thomas, J. K. The chemistry of excitation at interfaces. 1984. American Chemical Society. ACS Monograph N 181.

<sup>151</sup> Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99* (7), 2039-2044.

**Tabla 4.19.** Intensidades de picos  $I_1$  (375 nm) normalizados con respecto al pico  $I_3$  (383 nm) de los compuestos estudiados.

Compuesto	$I_1$ (375nm) (N)
Ligando <b>32</b>	1.69
Complejo <b>21</b>	1.71
Complejo <b>33</b>	1.74
Aducto <b>80</b>	1.80
Aducto <b>81</b>	1.71

Otro parámetro significativo es la relación entre la intensidad del pico del excímero  $I_e$  a 445 nm<sup>210</sup> y la del monómero  $I_m$  a 375 nm. En el complejo 33, la relación de intensidad  $I_e/I_m$  es de un orden de magnitud superior que en los otros compuestos. En las demás muestras estudiadas, la relación es muy pequeña como se puede observar en la Tabla 4.20. Los datos sugieren la ausencia del excímero, como se observa en el espectro de emisión (Figura 4.59). Esta ausencia puede deberse a la alta dilución de las muestras, o en el caso de los aductos a que las interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre la unidad de pireno y la superficie de los nanotubos dificulten, o impidan, la interacción de las dos moléculas de pireno necesarias para formar el excímero.

**Tabla 4.20.** Intensidades de picos del excímero ( $I_e$ ) y del monómero ( $I_m$ ) y relación  $I_e/I_m$

Compuesto	$I_m$ (375 nm) <sup>a)</sup>	$I_e$ (445 nm)	$I_e/I_m$
Ligando <b>15</b>	1.69	0.096	0.057
Complejo <b>3</b>	1.71	0.073	0.043
Complejo <b>16</b>	1.74	0.19	0.113
Aducto <b>71</b>	1.80	0.099	0.055
Aducto <b>72</b>	1.71	0.10	0.06

<sup>a)</sup> Las intensidades se expresan en unidades arbitrarias

<sup>210</sup> Li, M.; Jiang, M.; Zhang, Y. X.; Fang, Q. Fluorescence studies of hydrophobic association of fluorocarbon-modified poly(N-isopropylacrylamide). *Macromolecules* **1997**, *30* (3), 470-478.

#### 4.6.1.2. Fluorescencia DOTAmPegPireno

Con esta segunda familia de compuestos también se han estudiado todos los derivados de DOTAmPegPireno empezando por el ácido libre (44), los complejos de Gd (III) (22b) y de La (III) (45) y los aductos entre los nanotubos oxidados y los complejos de Gd (aducto 82) y de La (aducto 83), a concentraciones diferentes, como se muestra en la Tabla 4.21. De nuevo, las concentraciones se expresan tanto en mM como en mg/mL para poder comparar los complejos con los aductos, ya que se desconoce su peso molecular.

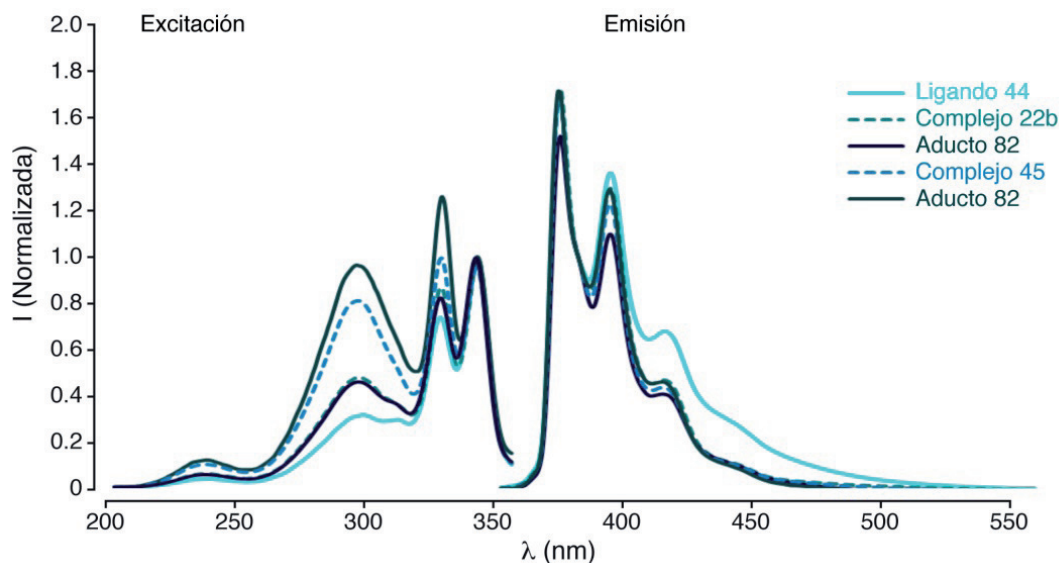
**Tabla 4.21.** Concentración de las muestras empleadas en la caracterización por fluorescencia de los derivados de DOTAmPegPireno

Compuesto	mM	mg/mL
Ligando 44 Ácido libre	$8.06 \times 10^{-8}$	$2.64 \times 10^{-6}$
Complejo 22b	$10^{-7}$	$4.6 \times 10^{-6}$
Complejo 45	$9.28 \times 10^{-8}$	$4.27 \times 10^{-8}$
Aducto 82 MWCNTs-US y complejo 22b de Gd (III)		$4.55 \times 10^{-5}$
Aducto 83 MWCNTs-US y complejo 45 de La (III)		$2 \times 10^{-4}$

Los aductos, ya que contienen menos unidades de pireno que los otros derivados, se han analizado a mayor concentración,  $4.55 \times 10^{-5}$  mg/mL para el aducto 82, y  $10^{-4}$  mg/mL para el aducto 83.

Los espectros de excitación y de emisión de fluorescencia normalizados se muestran en la Figura 4.60. Los espectros de excitación son especulares a los de emisión que en todos los derivados muestran tres máximos a 375, 395 y 415 nm, típicos de la emisión de pireno como monómero, respectivamente.<sup>210</sup>

<sup>210</sup> Li, M.; Jiang, M.; Zhang, Y. X.; Fang, Q. Fluorescence studies of hydrophobic association of fluorocarbon-modified poly(N-isopropylacrylamide). *Macromolecules* **1997**, *30* (3), 470-478.



**Figura 4.60.** Espectros de excitación ( $\lambda_{em} = 370$  nm) normalizado vs  $\lambda_N = 343$  nm y de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{ex} = 340$  nm) normalizado vs  $\lambda_N = 383$  nm de los derivados de DOTAmPegPireno.

La relación de intensidad entre el pico 1 a 375 nm ( $I_1$ ) y el pico 3 a 383 nm ( $I_3$ ) se muestra en la **Tabla 4.22** a continuación:

**Tabla 4.22.** Intensidades de picos  $I_1$  (375 nm) normalizados con respecto a  $I_3$  (383 nm) de los compuestos estudiados.

Compuesto	$I_{(375 \text{ o } 376 \text{ nm})}^a$
Ligando <b>44</b>	1.69
Complejo <b>22b</b>	1.71
Complejo <b>45</b>	1.69 <sup>b)</sup>
Aducto <b>82</b>	1.53
Aducto <b>83</b>	1.73

<sup>a)</sup> Las intensidades se expresan en unidades arbitrarias

<sup>b)</sup>  $I_1 = 376$  nm

En este caso también el entorno del fluoróforo es muy polar, y el pico 3 es más acentuado en el aducto **82**, donde la relación de intensidad de los picos es ligeramente inferior (1.53).

En los espectros de emisión de esta familia de derivados se observa en el ligando **44** un pico poco pronunciado a 445 nm que pertenece al excímero, como queda reflejado en la relación  $I_e/I_m$  de un orden de magnitud superior a la de los otros compuestos. Como en los derivados de

DOTAmaEtilendiaminaPireno no tiene lugar la formación del excímero, bien por las elevadas diluciones, o bien porque las interacciones  $\pi-\pi$  entre pireno y nanotubos de carbono dificulta, o impide, la interacción de dos moléculas de pireno entre sí. La relación entre las intensidades del pico del excímero (445 nm) y la del monómero a 375 nm, se refleja en la **Tabla 4.23**.

**Tabla 4.23.** Intensidades de picos del monómero ( $I_m$ ), del excímero ( $I_e$ ) y relación  $I_e/I_m$ .

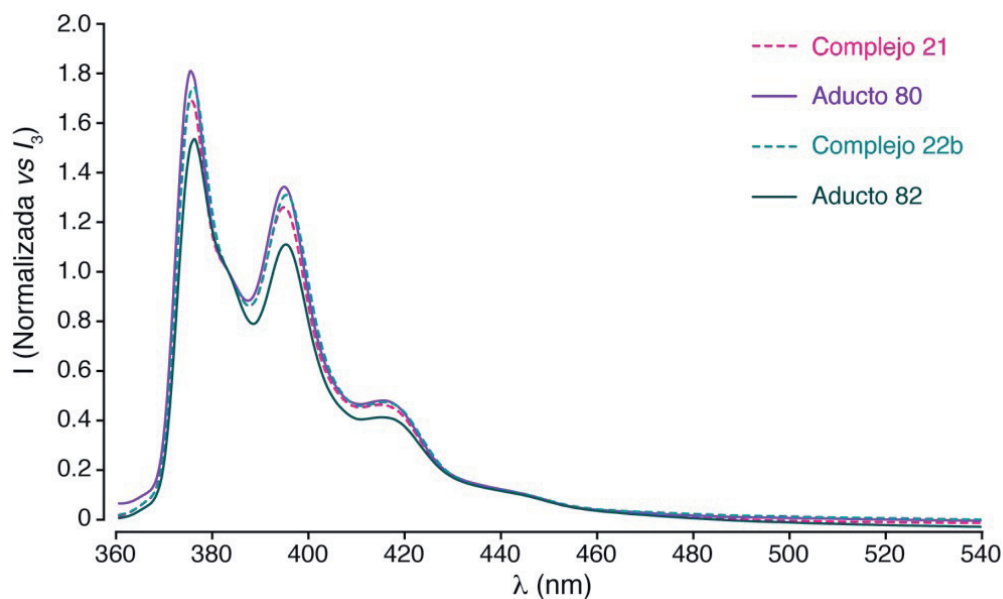
Compuesto	$I_m$ (375 o 376 nm) <sup>a)</sup>	$I_e$ (445 nm)	$I_e/I_m$
Ligando <b>44</b>	1.69	0.27	0.16
Complejo <b>22b</b>	1.71	0.09	0.06
Complejo <b>45</b>	1.69 <sup>b)</sup>	0.09	0.05
Aducto <b>82</b>	1.53	0.06	0.04
Aducto <b>83</b>	1.73	0.08	0.05

<sup>a)</sup> Las intensidades se expresan en unidades arbitrarias

<sup>b)</sup>  $I_1 = 376$  nm

#### 4.6.1.3. Comparación aducto 80 y 82.

En la **Figura 4.61**, como resumen, se muestran los espectros de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{exc}=340$  nm) de los complejos Gd(III)DOTAmaEtilendiaminaPireno (**21**, rosa), Gd(III)DOTAmaPegPireno (**22b**, azul) y de los aductos por interacciones  $\pi-\pi$  MWCNTsCOOH-Gd(III)DOTAmaEtilendiaminaPireno (**80**, morado) y MWCNTs-US Gd(III)DOTAmaPegPireno (**82**, verde oscuro). Los perfiles de los complejos entre sí son idénticos, así como los de los aductos.



**Figura 4.61.** Espectros de emisión de fluorescencia de los complejos 21 y 22b y de los aductos 80 y 82 ( $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm) normalizados con respecto a  $I_3$  (383 nm).

En la **Tabla 4.23** se muestran las relaciones de intensidades  $I_1/I_3$  e  $I_e/I_m$ . Cabe destacar como en todos el fluoróforo se encuentra en un entorno polar, igual en los complejos ( $I_1/I_3 = 1.71$ ). El aducto **80** presenta el entorno más polar (1.8), mientras que el aducto **82** muestra el menos polar (1.53). La relación  $I_e/I_m$  es similar en todos los casos y no se han dado los valores en los que no hay emisión, confirmando que no hay formación del excímero.

**Tabla 4.24.** Relación  $I_1/I_3$  e  $I_e/I_m$  para los complejos **21**, **22b** y los aductos **80** y **82**.

Compuesto	$I_1/I_3$	$I_e$ (445 nm)	$I_e/I_m$
Complejo <b>21</b>	1.71	0.073	0.04
Aducto <b>80</b>	1.8	0.099	0.05
Complejo <b>22b</b>	1.71	0.09	0.06
Aducto <b>82</b>	1.53	0.06	0.04

### 4.6.2. Relassività dei complessi di Gd(III) e degli addotti ottenuti

La relassività, parametro che descrive l'efficacia di un agente di contrasto per MRI, come descritto nel Capitolo 2.2 (Antecedentes), si definisce come l'aumento della velocità di rilassamento dei protoni dell'acqua a una concentrazione 1 mM di metallo paramagnetico, rispetto al mezzo diamagnetico, longitudinale  $r_{1p}$  e trasversale  $r_{2p}$ .

La velocità di rilassamento longitudinale dei protoni dell'acqua dipende da diversi parametri, tra i quali la temperatura, il pH, la concentrazione di un metallo paramagnetico.

Per la caratterizzazione dei complessi e degli addotti sono stati ottenuti i profili NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion), che mostrano la variazione della velocità di rilassamento longitudinale dei protoni dell'acqua in funzione del campo magnetico, e forniscono informazioni riguardanti il tempo di correlazione rotazionale ( $\tau_r$ ), il numero di idratazione del complesso ( $q$ ) e i tempi di rilassamento elettronico  $T_{1e}$  e  $T_{2e}$ , nelle cui equazioni compaiono i parametri  $\Delta^2$ , che tiene conto della modulazione dello Zero Field Splitting, ed il tempo di correlazione  $\tau_v$ .

I profili NMRD si ottengono misurando a temperatura costante i valori di  $T_1$  a diversi campi magnetici (da 0.01 a 70 MHz, in termini di frequenza protonica di Larmor), utilizzando due strumenti diversi:

ad alti campi (da 20 a 70 MHz) si realizzano misure discrete con un elettromagnete sintonizzabile; la sequenza utilizzata in questo caso è Inversion Recovery (Figura 4.62).

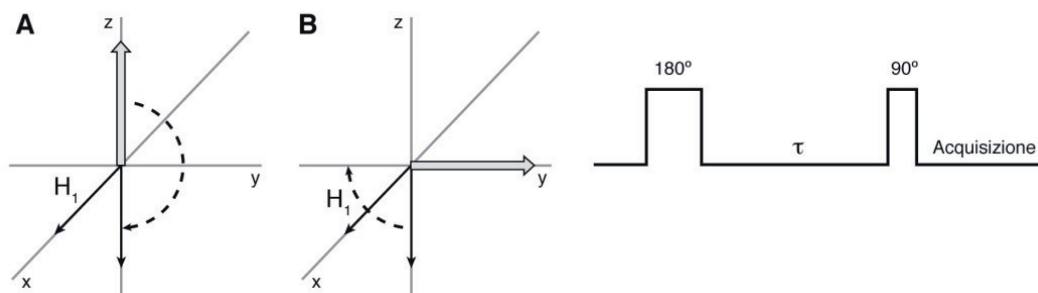
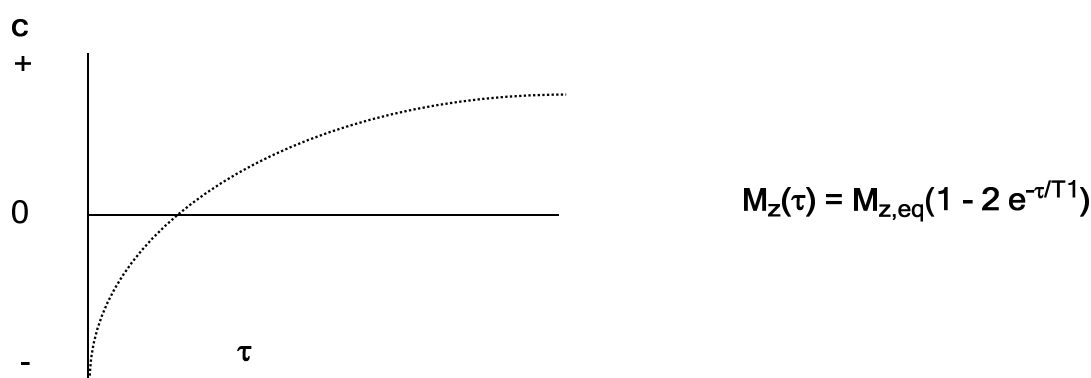


Figura 4.62. Sequenza Inversion Recovery

La sequenza inizia a tempo 0 con un impulso di  $180^\circ$  che inverte la magnetizzazione longitudinale portandola lungo l'asse - Z (a). A causa del rilassamento, la magnetizzazione longitudinale tende a ritornare alla sua posizione di equilibrio, passando per lo zero. Prima del raggiungimento dell'equilibrio, dopo un tempo  $\tau$  dall' impulso di  $180^\circ$ , viene applicato un impulso di  $90^\circ$  per ottenere magnetizzazione trasversale (b). La magnetizzazione, ora nel piano XY, inizia a ruotare attorno all'asse Z e a perdere fase generando un segnale tipo FID.



Equazione 4.4

L'ampiezza della FID dopo l' impulso di  $90^\circ$ , che è proporzionale al valore di  $M$  al tempo  $\tau$ , è rappresentata in funzione di  $\tau$ . Ogni punto è il risultato di una singola sequenza  $180^\circ$ ,  $\tau$ ,  $90^\circ$ .

A bassi campi (da 0.01 a 20 MHz) si realizza un'unica misura con un rilassometro a campo ciclico (Fast Field Cycling). Magneti a bassa induttanza commutano il campo molto rapidamente (nell'ordine dei millisecondi) a qualsiasi valore desiderabile (nell'intervallo 0,01-20 MHz con il rilassometro utilizzato per le misure), mantenendo la stabilità e l'omogeneità necessarie durante la misura. La magnetizzazione d'equilibrio di un campione dipende direttamente dal campo magnetico. Al variare del campo,  $M_0$  cambia seguendo un'esponenziale che è funzione del tempo, la cui costante di tempo corrisponde al valore di  $T_1$  al campo di rilassamento, come si può osservare nella Figura 4.63.



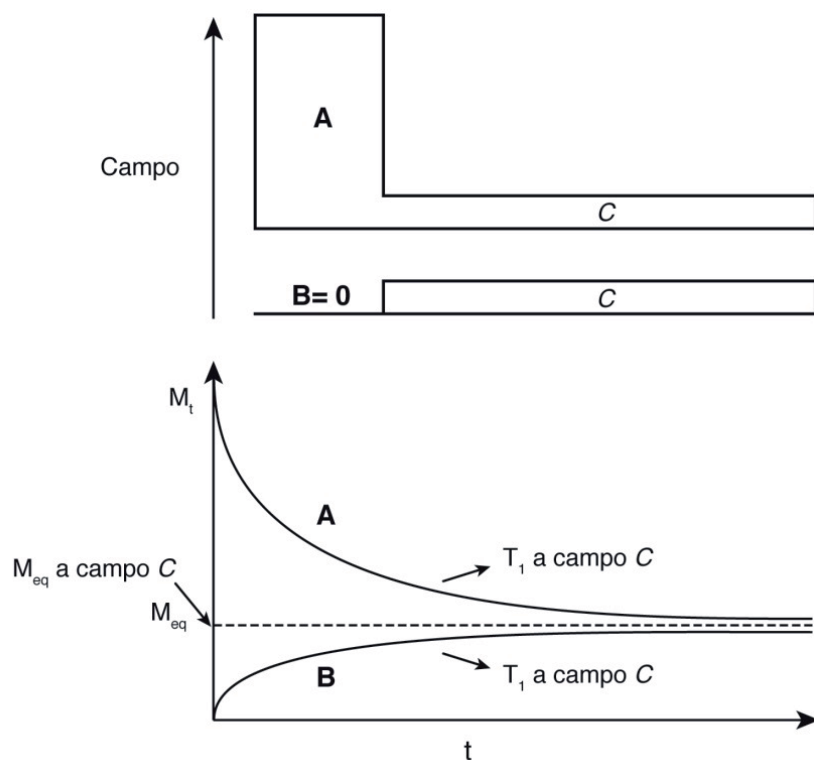


Figura 4.63. Misura di  $T_1$  con FFC

$T_1$  viene misurato utilizzando due sequenze diverse: a campi inferiori a 8 MHz si utilizza una sequenza che prevede una prepolarizzazione che precede il tempo di rilassamento e il tempo di lettura (Figura 4.64).

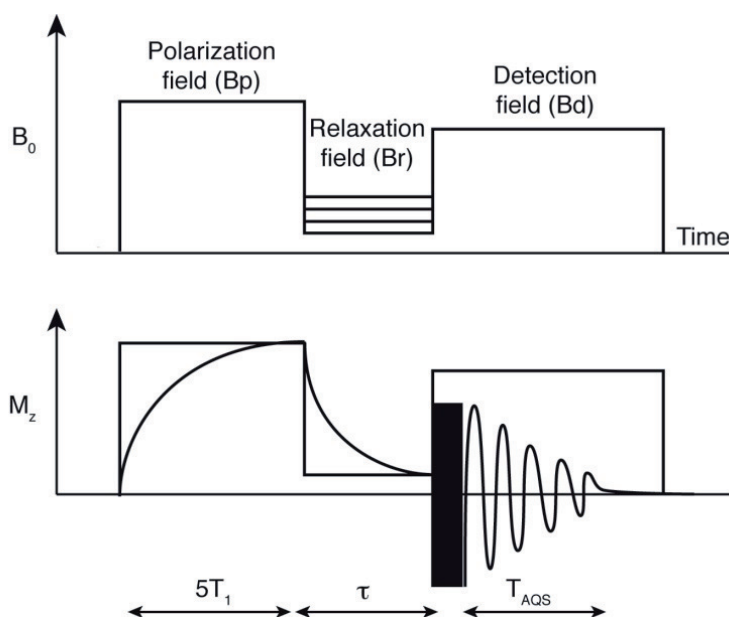
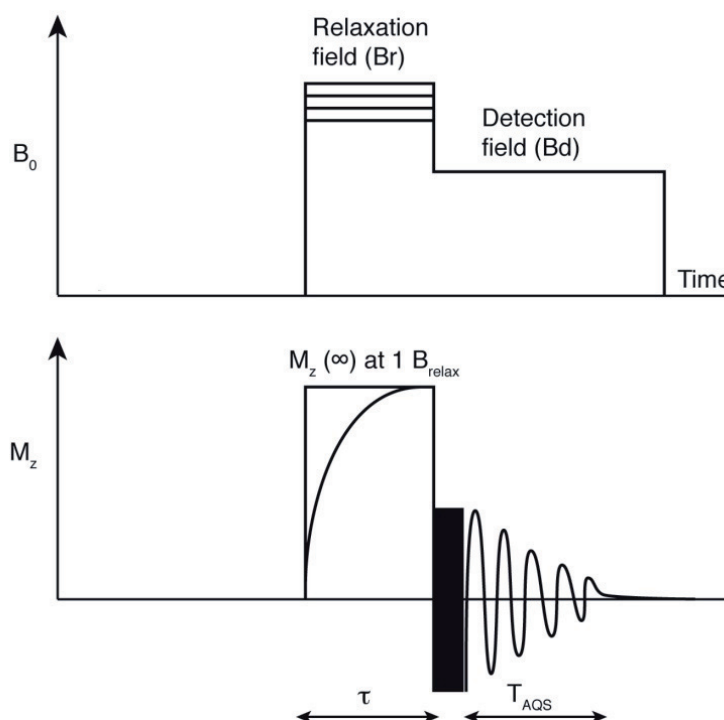


Figura 4.64. Sequenza Pre-Polarizzata

- A campi superiori a 8 MHz si utilizza una sequenza non polarizzata, come si può osservare nella **Figura 4.65**.



**Figura 4.65.** Sequenza non pre-polarizzata

Oltre ai profili NMRD, sono stati calcolati alcuni valori di  $r_{1p}$  a temperatura variabile per studiare l'influenza di questo parametro sulla relassività del campione in questione.

È stata calcolata  $r_{2p}$  di tutti i campioni.

I campioni dei quali è stata studiata la relassività sono i complessi di Gd, gli addotti ottenuti dai complessi di Gd e i nanotubi di carbonio, e i complessi di La(III) corrispondenti a quelli di Gd(III), con lo scopo di eliminare il contributo paramagnetico del metallo e riprodurre gli equivalenti diamagnetici.

Si è deciso inoltre di studiare i profili dei soli nanotubi, tanto ossidati come frammentati con gli ultrasuoni, e paragonarli agli addotti con i complessi di La.

I campioni dei quali è stato studiato il comportamento rilassometrico sono i seguenti:

- Gd(III)DOTAmaEtilendiamminaPirene (21);
- Gd(III)DOTAmaPegPirene (22b);
- addotto per interazioni  $\pi-\pi$  MWCNTsCOOH-La(III)DOTAmaEtilendiamminaPirene (81);
- addotto per interazioni  $\pi-\pi$  MWCNTsUS-shortened-La(III)DOTAmaPegPirene (83)
- MWCNTsCOOH, nanotubi ossidati;
- MWCNTsUS, nanotubi frammentati con gli ultrasuoni.
- addotto per interazioni  $\pi-\pi$  MWCNTsCOOH-Gd(III)DOTAmaEtilendiamminaPirene (80)
- addotto per interazioni  $\pi-\pi$  MWCNTsUS-Gd(III)DOTAmaPegPirene (82)

#### 4.6.2.1. Determinazione della concentrazione della specie paramagnetica

Per il calcolo della rilassività è necessaria la determinazione della concentrazione della specie paramagnetica presente in ogni campione.

Nel caso dei complessi di Gd sono stati usati due metodi diversi e nel calcolo della rilassività è stata usata una media tra i valori di concentrazione ottenuti.

Per quanto riguarda gli addotti, oltre a questi due metodi, si è anche tenuto conto dei dati ottenuti al TXRF.

Nel caso dei nanotubi, sia ossidati che frammentati con gli ultrasuoni, è stato decisivo poter determinare la concentrazione in soluzione dei nanotubi stessi, dato che la loro solubilità è risultata essere piuttosto bassa: è stato sviluppato un metodo spettrofotometrico che verrà descritto in seguito.

#### Metodo rilassometrico: digestione con HCl 6N

Il primo metodo è una digestione del complesso con acido cloridrico 6N. Si prepara una ampolla con 100  $\mu\text{L}$  di HCl 37 %, 50  $\mu\text{L}$  di campione e con 50  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata (BD), che viene centrifugata (2200 rpm X 3'), sigillata ermeticamente e messa in stufa per 12 ore; si centrifuga nuovamente, si preleva un'aliquota di 70  $\mu\text{L}$  per la misura di  $T_1$  a 21.5 MHz a 25°C. La concentrazione di Gd viene calcolata con l'Equazione 4.5:

$$[Gd] = \left[ \frac{(R_{1\text{oss}} - R_{1b})}{r_{1\text{Gd in HCl 6N}}} \right] \times 4 \quad \text{Equazione 4.5}$$

Dove  $R_{1b \text{ HCl6N}} = 0.5$  è la rilassività di una soluzione di cloridrico 6N a 21.5 MHz ed è considerata come bianco;  $r_{1p \text{ Gd in HCl 6N}} = 13.7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  è la rilassività del Gd in una soluzione di HCl 6N e 4 è il fattore di diluizione.

### Metodo Evans

Il secondo metodo impiegato, conosciuto come metodo Evans, è stato descritto da Peters e collaboratori<sup>211</sup> e determina la concentrazione del Gd dallo shift del picco del terbutile del *terz*-butanolo indotto dalla presenza di un metallo paramagnetico appartenente alla famiglia dei lantanidi in spettri <sup>1</sup>H-NMR in alta risoluzione.

L'esperimento viene condotto a 298 K utilizzando un tubo coassiale: nel tubo interno si introducono 50 µL di campione e 5 µL di *terz*-ButOH, mentre nel tubo esterno 500 µL di D<sub>2</sub>O e 50 µL di *terz*-ButOH. Si registra uno spettro protonico con 4 scansioni, si osserva lo shift dell'acqua e del *terz*-butanolo e si calcola la concentrazione del Gd con l'Equazione 4.6:

$$\Delta ppm = \frac{4\pi C_{mol} \times \frac{1s}{3}}{T (K)} (\mu_{eff})^2 \quad \text{Equazione 4.6}$$

$$[Gd]_{mol} = \frac{\Delta\delta \times T}{519.08 (\mu_{eff})^2}$$

Dove il momento magnetico effettivo del Gd è  $\mu_{eff \text{ Gd}} = 7.94$

### Metodo spettrofotometrico UV-visibile

Nel caso dei nanotubi di carbonio prendendo spunto da Marsh e collaboratori<sup>212</sup> è stato sviluppato un metodo spettrofotometrico per determinarne la concentrazione, dato che come si vedrà in seguito non si

<sup>211</sup> Corsi, D. M.; Platas-Iglesias, C.; van Bekkum, H.; Peters, J. A. Determination of paramagnetic lanthanide(III) concentrations from bulk magnetic susceptibility shifts in NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2001**, 39(11), 723-726.

<sup>212</sup> Marsh, D. H.; Rance, G. A.; Zaka, M. H.; Whitby, R. J.; Khlobystov, A. N. Comparison of the stability of multiwalled carbon nanotube dispersions in water. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007**, 9(40), 5490-5496.

comportano come una specie diamagnetica ed è necessario conoscerne il contributo nel calcolo della relassività degli addotti.

Nella preparazione dei campioni si decide di aggiungere Pluronic F68 (2%) per favorire la solubilità dei nanotubi in acqua. Si registrano spettri UV-visibili di ogni campione da 300 a 600 nm e si tiene conto dell'assorbanza di ogni campione a una determinata lunghezza d'onda. Si calcola il rapporto tra le assorbanze dei due campioni che si vogliono paragonare a partire da 350 nm (per evitare l'interferenza del pirene) fino a 600 nm, tenendo conto del fattore di diluizione al quale è stato sottoposto ogni campione e si realizza una media dei rapporti trovati. Il valor medio ottenuto sarà il fattore di correzione (FC) che si introdurrà nel calcolo della relassività "pesando" in tal modo il contributo dei nanotubi sulla relassività.

A titolo d'esempio e per essere più espliciti, nel caso di due campioni a concentrazioni diverse:

$$FC = \left\{ \left[ \frac{FD(x) \times A_{\lambda 300}(x)}{FD(y) \times A_{\lambda 300}(y)} \right] + \dots \left[ \frac{FD(x) \times A_{\lambda 600}(x)}{FD(y) \times A_{\lambda 600}(y)} \right] \right\} / n \quad \text{Equazione 4.7}$$

Dove FC è il fattore di correzione che si introdurrà nel calcolo della relassività ( $r_{1p}$ ) in presenza di nanotubi di carbonio. FD è il fattore di diluizione di ogni campione usato nella registrazione dello spettro UV-visibile; x e y sono i due campioni che si vogliono confrontare ed n è il numero di misure considerate, per esempio se si sono prese in considerazione misure da 350 a 600 nm in intervalli di 50 nm, n sarà 6.

#### 4.6.2.2. Complessi di Gd (III)

Secondo i due metodi utilizzati le concentrazioni di Gd ottenute per i due complessi di Gd(III)DOTAmaEtilendiamminaPirene (21) e Gd(III)DOTAmaPegPirene (22b) dei quali è stato studiato il comportamento rilassometrico sono riportate nella **Tabella 4.25**.

**Tabella 4.25** Concentrazione dei complessi di Gd(III) studiati

Campione	Digestione con HCl	Evans	Media
DOTAmaEtilendiamminaPirene <b>21</b>	0.08	n.d.	0.08
DOTAmaPegPirene <b>22b</b>	0.5	0.6	0.55

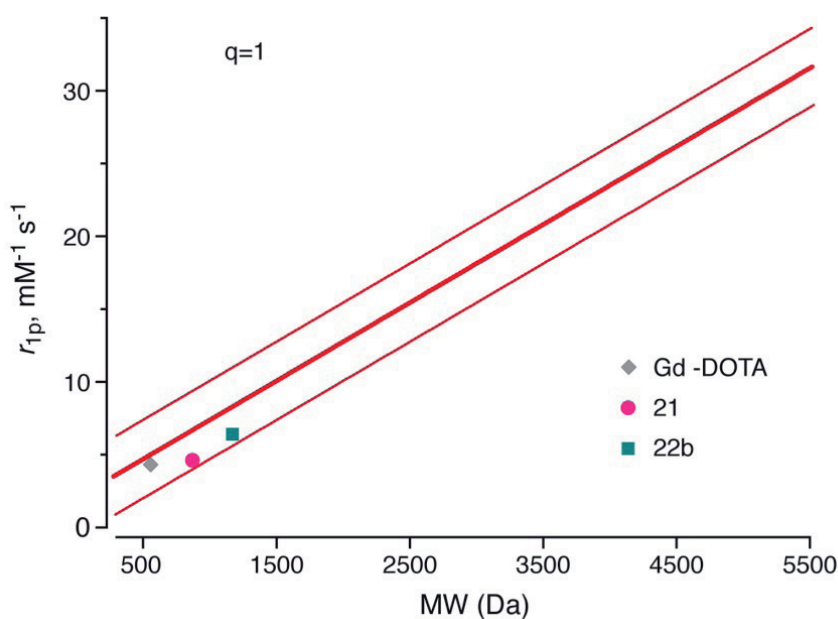
n.d. = non determinato

Nella **Tabella 4.26**, come riassunto, si riportano i pesi molecolari dei complessi, i valori di  $r_{1p}$  a 21.5 MHz a 25 e 37 °C e i valori di  $r_{2p}$  tra 20 e 70 MHz. Il complesso **22b** di maggior peso molecolare mostra valori più elevati di rilassività tanto di  $r_{1p}$  quanto di  $r_{2p}$ ; si può osservare come aumentando la temperatura ci sia in entrambi i campioni una leggera diminuzione dei valori di rilassività.

**Tabella 4.26.** Valori di  $r_{1p}$  (21.5MHz) e  $r_{2p}$  (20-70 MHz) dei complessi 21 e 22b

Campione	PM(g/mol)	$r_{1p}$ (21.5 MHz)		$r_{2p}$ (20-70 MHz)
		25 °C	37 °C	25 °C
DOTAmaEtilendiamminaPirene <b>21</b>	871.06	4.6	4.2	$4.6 \pm 0.1$
DOTAmaPegPirene <b>22b</b>	1169.40	6.4	5.6	$7.1 \pm 0.2$

La maggior rilassività riscontrata nel complesso di maggior peso molecolare era prevedibile ed è consona ai valori di rilassività di altri complessi analoghi. Nella **Figura 4.66** si riporta una banda che rappresenta la tendenza di  $r_{1p}$  vs peso molecolare calcolata a partire da complessi di Gd(III) con una molecola di acqua coordinata ( $q=1$ ). Si esplicitano i valori di Gd-DOTA e dei complessi **21** e **22b** ottenuti.



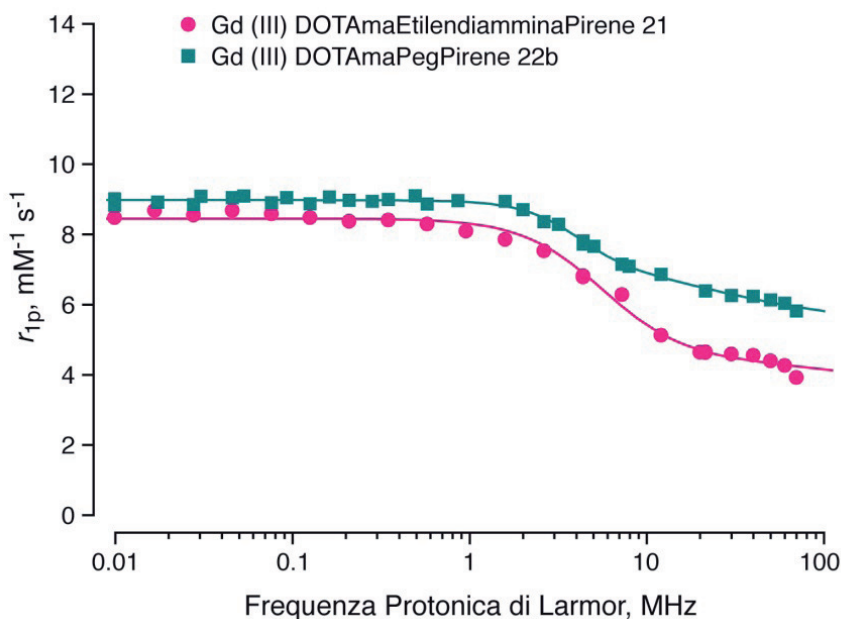
**Figura 4.66.** Relazione rilassività vs peso molecolare di complessi di Gd(III) con  $q=1$ .

I  $T_1$  dai quali sono stati calcolati i profili NMRD sono stati registrati a 25°, a pH = 7.4 da 0.01 a 70 MHz.

I profili NMRD vengono fittati secondo la teoria della rilassività di Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM). Il fitting si realizza assumendo la presenza di una molecola di  $H_2O$  coordinata ( $q=1$ ), a una distanza ( $a$ ) di 3.1 Å dallo ione metallico ( $r$  GdH) e fissando i valori della distanza tra la molecola di solvente appartenente alla sfera esterna più vicina e il metallo paramagnetico a 3.6 Å e del loro coefficiente di diffusione ( $D$ ) a  $2.2 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ .

La velocità di intercambio dell'acqua ( $k_{ex} = 1/\tau_m$ ) si fissa a  $1 \text{ } \mu\text{s}$  in accordo con valori precedentemente ottenuti per chelati di simili caratteristiche.<sup>213</sup>

I parametri dei tempi di rilassamento elettronico ( $\Delta^2, \tau_v$ ) ed il tempo di correlazione rotazionale ( $\tau_R$ ) si lasciano come variabili.



**Figura 4.67.** Profili NMRD dei complessi 21 e 22b

Come atteso, i due complessi presentano un classico andamento del profilo NMRD caratterizzato da una dispersione centrata intorno a 5 MHz.

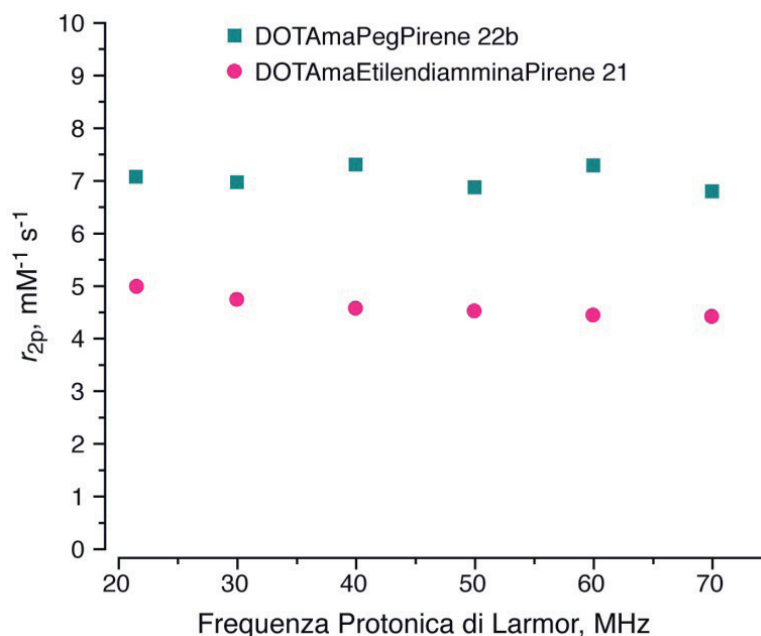
<sup>213</sup> Tei, L.; Gugliotta, G.; Baranyai, Z.; Botta, M. A new bifunctional Gd-III complex of enhanced efficacy for MR-molecular imaging applications. *Dalton Transactions* **2009**, (44), 9712-9714.

Come già commentato nel caso del valore di  $r_{1p}$  a 21.5 MHz, nei profili NMRD si possono osservare con chiarezza i valori più elevati di relassività per il complesso **22b**, quello di maggior peso molecolare. I valori dei parametri sopra elencati, ottenuti dal fitting dei profili sono mostrati nella **Tabella 4.27**. È importante mettere in risalto come **22b** risulti possedere un tempo di correlazione rotazionale ( $\tau_R$ ) più elevato che corrisponde ad un movimento più lento della molecola di complesso in soluzione, con conseguente aumento della relassività del sistema.

**Tabella 4.27.** Parametri ottenuti dal fitting dei profili NMRD dei complessi 21 e 22b

Campioni	$\Delta^2$ ( $\cdot 10^{19} \text{ s}^{-2}$ )	$\tau_v$ (ps)	$\tau_R$ (ps)	$\tau_M$ ( $\mu\text{s}$ )	$a$ (Å)	$D$ ( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ )	
<b>21</b>	$4.0 \pm 0.9$	$15 \pm 0.3$	$73 \pm 4$	1	3.6	2.2	$R^2=0.992$
<b>22b</b>	$2.3 \pm 0.08$	$35 \pm 0.1$	$152 \pm 3$	1	3.6	2.2	$R^2=0.994$

I valori di  $r_{2p}$  sono costanti nell'intervallo di campi magnetici ai quali sono state effettuate le misure, che sono state registrate a 25°C a pH=7.4, come si può osservare nella **Figura 4.68**.



**Figura 4.68.**  $r_{2p}$  dei complessi di Gd(III) 21 e 22b



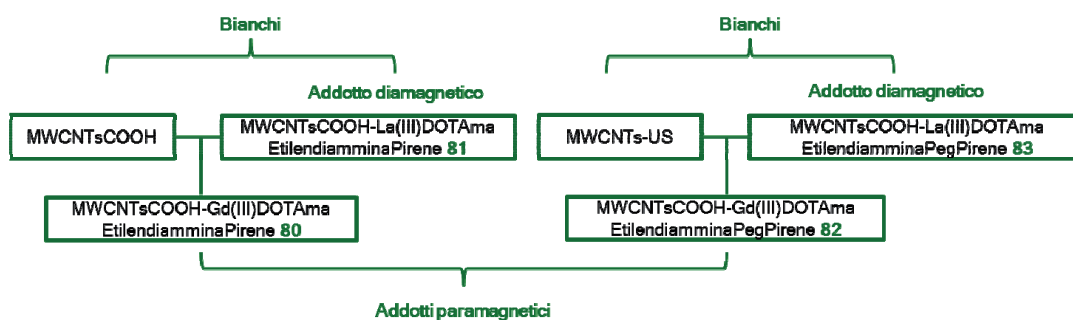
#### 4.6.2.3. Nanotubi di Carbonio (MWCNTs) e addotti diamagnetici

Per favorire la solubilità dei nanotubi in soluzione, come si è commentato in precedenza, si aggiunge il copolimero Pluronic F68.

La velocità di rilassamento di una soluzione di Pluronic F68 al 2% è del tutto simile a quella di una soluzione di acqua bidistillata, variando da  $0.37 \text{ s}^{-1}$  a  $0.35 \text{ s}^{-1}$  andando da 0.01 MHz a 20 MHz, rispettivamente.

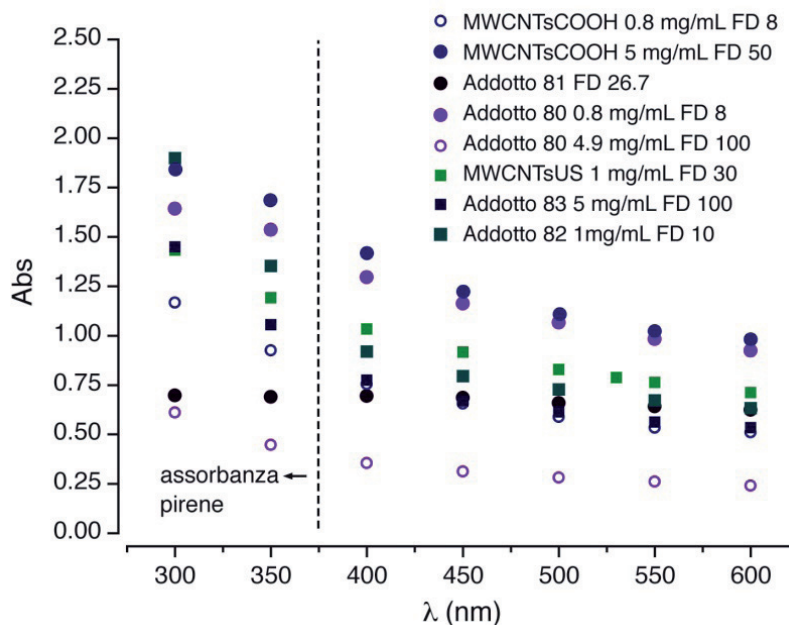
Si è anche verificato che la sua presenza non altera il contributo della specie in soluzione, confrontando il profilo NMRD di una soluzione dell'addotto per interazioni  $\pi-\pi$  MWCNTsCOOH - Gd(III)DOTAmaEtilendiamminaPirene, prima e dopo l'aggiunta di Pluronic F68 al 2%.

Per semplicità, in primo luogo si descrivono i dati relativi ai nanotubi ossidati (MWCNTsCOOH) e all'addotto tra questi nanotubi e La(III)DOTAmaEtilendiamminaPirene (**81**), che sono i bianchi dell'addotto **80** (formato con il complesso **21**); in secondo luogo quelli relativi ai nanotubi frammentati con gli ultrasuoni (MWCNTs-US) e all'addotto tra questi stessi nanotubi e il complesso di La(III)DOTAmaPegPirene (**83**), che sono i bianchi dell'addotto **82** (formato con il complesso **22b**). Infine si paragonano i due tipi di nanotubi. (Schema 4.2)



Schema 4.2. Analisi dati relassività

A seguire, si mostrano i dati spettroscopici di tutti i campioni contenenti nanotubi di carbonio, inclusi gli addotti **80** e **82**, a partire dai quali sono stati calcolati, come è stato spiegato nell'introduzione al capitolo, i fattori di correzione necessari nel paragone della relassività di due campioni a concentrazioni diverse.



**Figura 4.69.** Dati spettroscopici UV-visibili dei campioni contenenti nanotubi di carbonio: nanotubi di carbonio ossidati e frammentati con gli ultrasuoni, addotti tra nanotubi di carbonio e complessi di La e addotti tra nanotubi di carbonio e complessi di Gd.

### MWCNTsCOOH e addotto 81

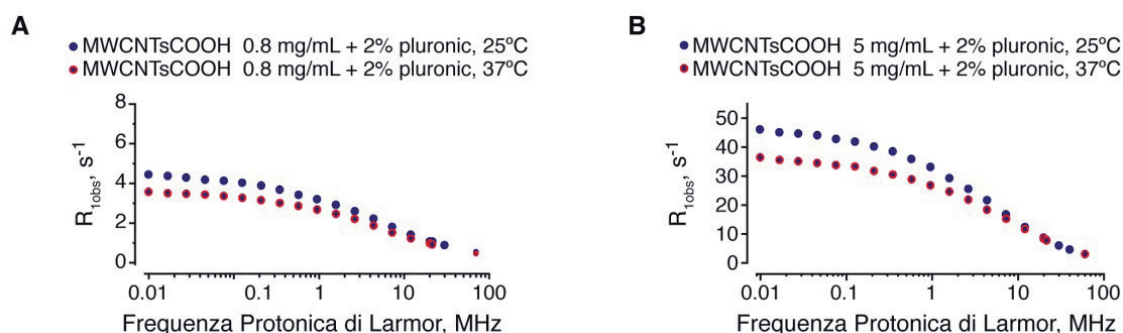
Si registra il profilo NMRD a 25 e 37°C, di due preparazioni indipendenti dei nanotubi ossidati: preparazione A e B, ottenute a partire da 0.8 mg/mL e 5 mg/mL di nanotubi, rispettivamente. I nanotubi presentano valori di  $R_{1\text{obs}}$  elevati, dovuti alla presenza di impurezze paramagnetiche e/o a difetti nella loro struttura. Wang e collaboratori<sup>214</sup> riportano un elevato momento magnetico dei nanotubi di carbonio e lo attribuiscono alla presenza di impurezze metalliche, nel loro caso di Ni, derivate dai catalizzatori impiegati nella produzione dei nanotubi. Parallelamente Ananta e collaboratori<sup>215</sup> descrivono come i valori elevati di  $R_{2\text{obs}}$  riscontrati siano dovuti alla natura dei nanotubi di carbonio e non alla presenza di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  osservando maggior relassività a minor concentrazione di particelle di ossido ferroso-ferrico. Altri

<sup>214</sup> 4. Wang, J.; Beeli, P.; Ren, Y.; Zhao, G. m. Giant magnetic moment enhancement of nickel nanoparticles embedded in multiwalled carbon nanotubes. *Physical Review B* **2010**, *82* (19), 193410-1: 193410-4.

<sup>215</sup> Ananta, J. S.; Matson, M. L.; Tang, A. M.; Mandal, T.; Lin, S.; Wong, K.; Wong, S. T.; Wilson, L. J. Single-Walled Carbon Nanotube Materials as T-2-Weighted MRI Contrast Agents. *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113* (45), 19369-19372.

autori<sup>216</sup> infatti, come si commenterà più avanti, giustificano il magnetismo dei nanotubi di carbonio come causato dalle inomegeneità presenti sulla superficie del nanotubo.

Si osserva come a temperatura più elevata i valori di relassività siano leggermente inferiori, ad indicare che la velocità di scambio dell'acqua in prossimità delle impurezze paramagnetiche presenti nei nanotubi è sufficientemente veloce da non limitarne il contributo (Figura 4.70).



**Figura 4.70.**  $R_{1obs}$  di due campioni a concentrazioni diverse di nanotubi ossidati a 25 e 37°C.

A titolo di esempio, si riporta nel dettaglio il procedimento seguito per confrontare i dati a 25 °C dei due campioni a diversa concentrazione: (1) calcolo del fattore di correzione FC per la concentrazione dei nanotubi e (2) formula utilizzata per il calcolo della velocità di rilassamento relativa.

La **Tabella 4.28** riporta i dati UV-visibile dai quali si calcola il fattore di correzione FC, come spiegato precedentemente:

**Tabella 4.28.** Calcolo di FC per due campioni a concentrazioni diverse di MWCNTs ossidati

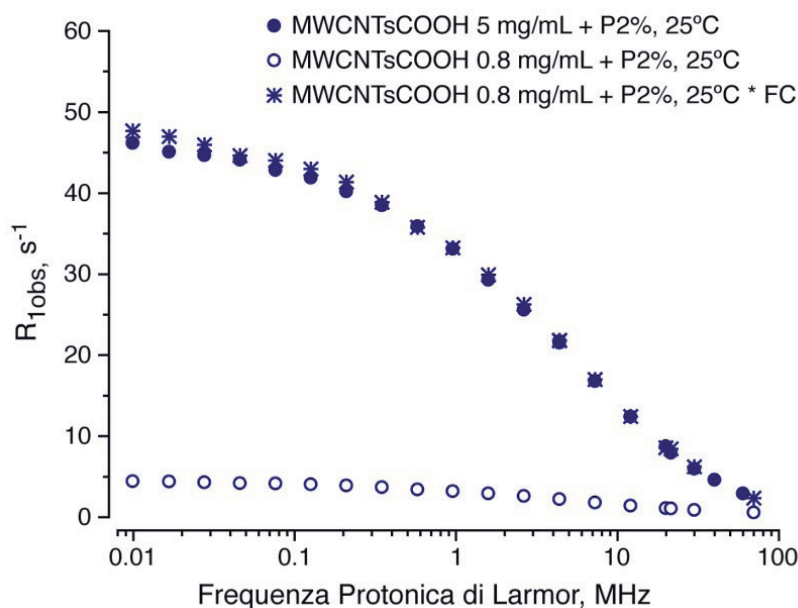
	MWCNTsCOOH 0.8 mg/mL (A)	MWCNTsCOOH 5mg/mL (B)	FC	FC Medio
$\lambda$ nm	FD 8	FD 50		11.712
400	0.76	1.41	11.595	
450	0.668	1.222	11.433	
500	0.59	1.106	11.716	
550	0.539	1.021	11.839	
600	0.512	0.981	11.975	

<sup>216</sup> Glenis, S.; Likodimos, V.; Guskos, N.; Lin, C. L. Magnetic properties of multiwall nanotubes. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2004**, 272, 1660-1661.

La preparazione A risulta essere circa 12 volte meno concentrata rispetto a quella B (e non solo circa 6 volte meno concentrata come si calcolerebbe dal rapporto 5 mg/0.8 mg). Questo significa che la concentrazione iniziale, così come il processo di sonicazione e poi centrifugazione, influenza la quantità di campione in grado di passare in soluzione/sospensione. Una volta ottenuto il fattore di correzione, lo si introduce nel calcolo di  $R_1$ , secondo l' Eq. 4.8:

$$R_{1 \text{ corretto per A rispetto a B}} = (R_{1 \text{ obs preparazione A}} - 0.38) * CF + 0.38 \text{ Eq. 4.8}$$

dove 0.38 è il contributo diamagnetico dell'acqua, ottenendo un nuovo profilo che riporta la velocità di rilassamento che il campione A avrebbe se fosse concentrato come quello B, come si può osservare nella Figura 4.71.

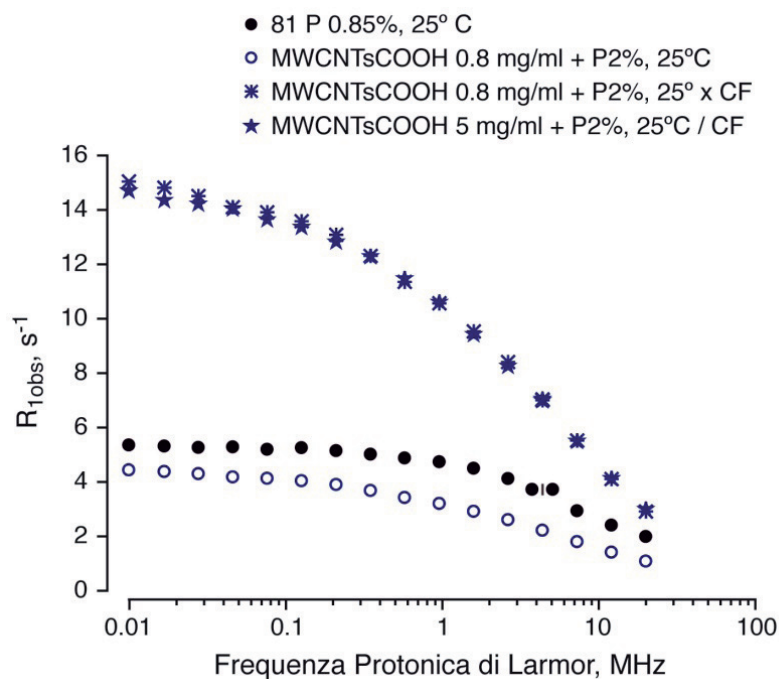


**Figura 4.71.**  $R_{1 \text{ obs}}$  di due campioni a concentrazioni diverse e poi normalizzate di MWCNTsCOOH.

Visto che le due curve praticamente coincidono, si può concludere che il metodo sviluppato riesce a rendere conto del contributo derivante da diverse concentrazioni di nanotubi.

L'addotto 81 (Figura 4.72) (MWCNTsCOOH-La(III)DOTAmaEtilendiamminapirene), è stato confrontato con il campione

MWCNTsCOOH 0.8 mg/mL (FC = 0.277) e con il campione MWCNTsCOOH 5 mg/mL (FC = 3.25). Si osserva come il profilo rilassometrico dell'addotto mostri un andamento diverso e non coincidente con quello dei nanotubi da cui deriva. Probabilmente la ragione è da ricercare nel diverso percorso di preparazione subito da questo campione: altamente insolubile prima dell'aggiunta di Pluronic, per cercare di favorirne la solubilità in acqua, è stato sottoposto a ripetuti cicli di sonicazione con il sonicatore a punta, che potrebbero aver alterato le dimensioni e la natura dei nanotubi o aver denaturalizzato il copolimero aggiunto. I valori di  $R_{1\text{obs}}$  più bassi si accordano con specie a più basso peso molecolare. Anche i dati UV dell'addotto sono anomali rispetto a tutti gli altri, essendo piatti in tutto il range di lunghezze d'onda indagato (Figura 4.69). Nel caso dell'addotto 83 e dei MWCNTs-US, non si osserva una differenza così sostanziale.

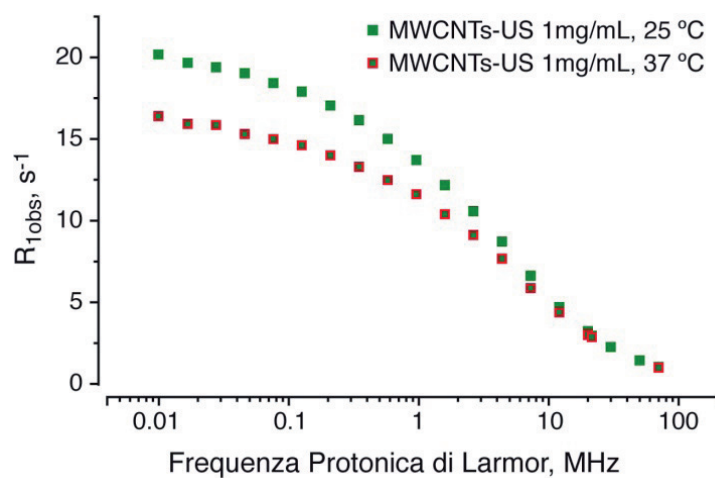


**Figura 4.72.**  $R_{1\text{obs}}$  dell'addotto 81 e di MWCNTsCOOH normalizzati rispetto all'addotto 81

### MWCNTs-US e addotto 83

Anche nel caso dei nanotubi frammentati con gli ultrasuoni sono stati registrati i profili rilassometrici a due temperature (25 e 37°C) e si è

verificato che a temperatura più elevata i valori di rilassività sono leggermente inferiori.



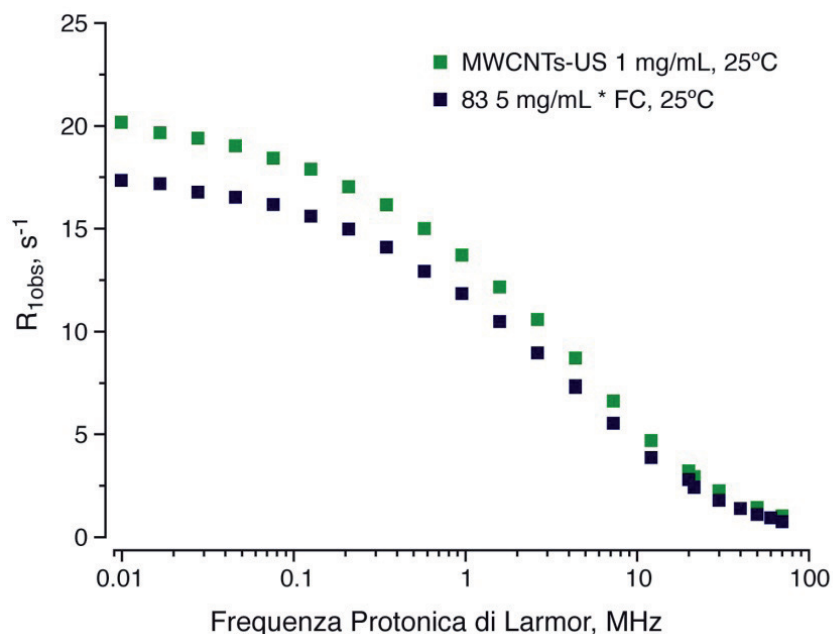
**Figura 4.73.**  $R_{1obs}$  di MWCNTs-US a 25 e 37°C

È stato calcolato il fattore di correzione per poter paragonare i MWCNTs-US con l'addotto 83 MWCNTs-US-La(III)DOTAmaEtilendiamminaPegPirene secondo i dati mostrati nella **Tabella 4.29**.

**Tabella 4.29.** Calcolo di FC per il paragone tra **MWCNTs-US** e l'addotto **83**

	MWCNTsUS 1mg/mL	Addotto 83	FC	FC Medio	STD
$\lambda$ nm	FD 30	FD 100			
400	1.034	0.775	0.400	0.405	0.005
450	0.917	0.669	0.411		
500	0.828	0.614	0.405		
550	0.763	0.562	0.407		
600	0.711	0.534	0.399		

Si è quindi proceduto all'ottenimento del nuovo profilo di  $R_{1obs}$ . E' importante mettere in risalto che i due profili non coincidono perfettamente, ma i dati non differiscono nell'andamento, risultano solo leggermente scalati. Se si applicasse 0.46 come FC si sovrapporrebbero perfettamente.



**Figura 4.74.**  $R_{1obs}$  di MWCNTs-US e dell'addotto 83 normalizzato rispetto all'addotto a MWCNTs-US.

Dato che sono stati studiati sia i soli nanotubi che gli addotti diamagnetici come bianchi degli addotti paramagnetici, si è voluto realizzare un confronto tra i due tipi di bianchi per vedere se si ci sono delle differenze.

#### Paragone MWCNTsCOOH e MWCNTs-US

Si confrontano i nanotubi ossidati con quelli frammentati con gli ultrasuoni per verificare se i due processi di frammentazione influiscono sulla velocità di rilassamento delle loro soluzioni acquose. Per poter tener conto di tutti i fattori in gioco si riporta nella seguente **Tabella 4.30** il contenuto metallico dei campioni ottenuto da misure di TXRF.

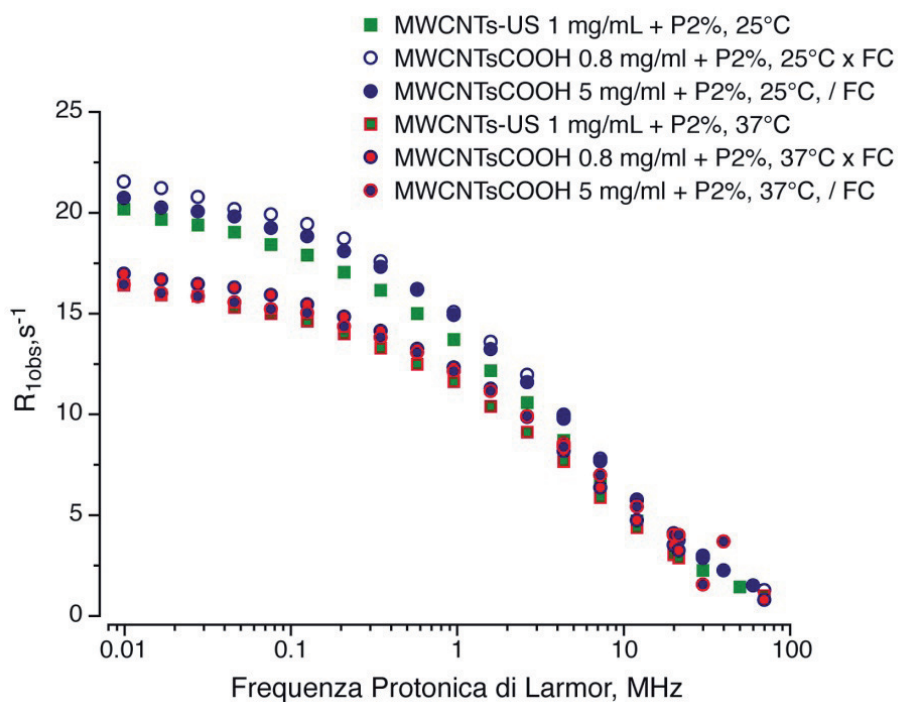
**Tabella 4.30.** Contenuto metallico % determinato con TXRF di MWCNTsCOOH e MWCNTs-US

Campioni	Metalli mg/mL (%)			
	Fe	Co	Ni	Zn
MWCNTsCOOH	0.038	0.23	0.004	0.006
MWCNTsUS	0.071	0.27	0.07	0.004

Si può osservare come il metodo ossidativo promuova una rimozione più efficace dei metalli derivati dai catalizzatori impiegati nella produzione dei nanotubi di carbonio con il metodo CVD.

Come negli esempi precedenti, anche in questo caso si confrontano i valori di  $R_{1obs}$  dei due campioni alle temperature di 25 e 37°C.

Si calcolano i fattori di correzione dai dati UV-Visibile e nel caso di MWCNTsCOOH (0.8 mg/mL) si dovrà moltiplicare per  $FC = 5.21$ , mentre per MWCNTsCOOH (5 mg/mL), più concentrato, si dovrà dividere per 2.25.

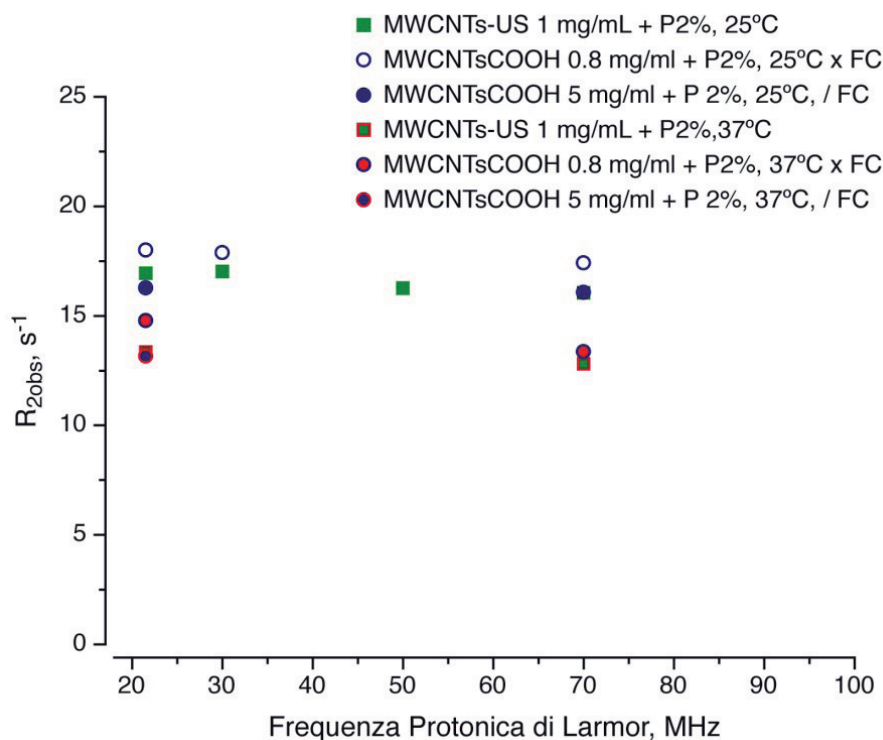


**Figura 4.75.** Confronto  $R_{1obs}$ , a 25 e 37°C, tra i nanotubi ossidati MWCNTsCOOH e frammentati con gli ultrasuoni MWCNTs-US.

Anche in questo caso i valori di velocità di rilassamento a 37°C sono inferiori rispetto a quelli a 25°C.

Si studia  $R_2$  dei nanotubi ossidati e frammentati con gli ultrasuoni e i valori risultano costanti nell'intervallo di campi magnetici studiati e diminuiscono con la temperatura. Come nel caso di  $R_{1obs}$ , per poter confrontare campioni a concentrazioni diverse, si ricalcola  $R_{2obs}$  tenendo conto dei fattori di correzione precedentemente ottenuti, come si può osservare nella **Figura 4.76**.





**Figura 4.76.** Confronto  $R_{2obs}$ , a 25 e 37°C tra nanotubi ossidati **MWCNTsCOOH** e frammentati con gli ultrasuoni **MWCNTs-US**.

Anche nel caso di  $R_{2obs}$  all'aumentare della temperatura diminuiscono i valori di velocità di rilassamento.

Si studia inoltre la relazione  $r_{2p}/r_{1p}$  dei campioni, tenendo conto delle velocità di rilassamento del bianco ( $R_{1b} = 0.38$ ,  $R_{2b} = 0.485$ ), secondo la relazione:

$$\frac{R_{2oss} - R_{2b}}{R_{1oss} - R_{1b}}$$

dove non è necessario conoscere il termine [specie paramagnetiche] perchè questo si elide, essendo presente ed uguale nelle espressioni di rilassività longitudinale e trasversale per uno stesso campione.

**Tabella 4.31.** Rapporti tra  $r_{2p}$  e  $r_{1p}$  di MWCNTs-US, MWCNTsCOOH e Addotto 74 rispetto a MWCNTs-US a 21. 5 MHz, a 25 e 37°C

	$R_{1oss}$	$R_{2oss}$	Ratio $r_{2p}/r_{1p}$	$R_{1oss}$	$R_{2oss}$	Ratio $r_{2p}/r_{1p}$
Campioni	25°C	25°C	25°C	37°C	37°C	37°C
MWCNTs-US +P2%	2.94	16.95	6.43	2.86	13.47	5.23
MWCNTsCOOH 0,8 mg/mL + P2%*FC	3.97	17.99	4.87	3.25	14.77	4.98
MWCNTsCOOH 5 mg/mL + P2%/FC	3.74	16.27	4.70	3.69	13.16	3.83
Addotto 83 5 mg/mL + P2% /FC	2.43	14.16	6.67	2.41	11.76	5.55

Nel caso di MWCNTs-US il rapporto  $r_{2p}/r_{1p}$  è di 6.4, molto simile al valore del rapporto  $r_{2p}/r_{1p}$  (6.6) dell'addotto 83. Nel caso dei nanotubi ossidati MWCNTsCOOH il rapporto è 4.7-4.9, inferiore dovuto al valore più elevato di  $R_1$ , essendo  $R_2$  simile. I carbossilati presenti sui nanotubi ossidati potrebbero avere un effetto sull'impaccamento dei nanotubi agendo sulla diffusione dell'acqua. Di fatto i nanotubi ossidati sono leggermente più corti, l'intervallo di distribuzione di lunghezze va da 50 a 300 nm, valore medio intorno a 130 nm, mentre nel caso dei frammentati con gli ultrasuoni il valore medio si aggira intorno ai 180 nm.

I valori elevati di  $R_2$  dei nanotubi di carbonio sono ampiamente riportati in letteratura da diversi autori<sup>215</sup> che li descrivono come potenziali agenti di contrasto  $T_2$ . Tuttavia non risulta chiara l'origine del forte contributo su  $T_2$ . Ananta e collaboratori<sup>215</sup> descrivono come preparazioni di nanotubi di carbonio con diverso contenuto in Fe, mostrino valori di  $R_2$  che non sono direttamente correlati alla presenza del Fe, infatti i nanotubi con minor contenuto risultano avere  $R_2$  maggiori. Richard et al,<sup>217</sup> descrivono dei sistemi anfifilici di Gd(III)DTPA-CNTs e osservano significativi valori di  $R_2$  nei campioni a minor concentrazione di Gd(III). Spiegano il fenomeno riscontrato per la presenza stessa dei nanotubi di carbonio e non per

<sup>215</sup> Ananta, J. S.; Matson, M. L.; Tang, A. M.; Mandal, T.; Lin, S.; Wong, K.; Wong, S. T.; Wilson, L. J. Single-Walled Carbon Nanotube Materials as T-2-Weighted MRI Contrast Agents. *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113* (45), 19369-19372.

<sup>217</sup> Richard, C.; Doan, B. T.; Beloeil, J. C.; Bessodes, M.; Toth, E.; Scherman, D. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes with amphiphilic Gd3+ chelates: Toward powerful T-1 and T-2 MRI contrast agents. *Nano Letters* **2008**, *8* (1), 232-236

l'effetto del metallo paramagnetico. Glenis e collaboratori<sup>216</sup> descrivono i nanotubi di carbonio come giganti fili molecolari coniugati con una lunghezza di coniugazione corrispondente alla lunghezza del tubo che creano forte disomogeneità e potenziali effetti di suscettività magnetica. Continuano descrivendo gli stati elettronici di un nanotubo di carbonio che risultano essere formati da sottobande energetiche popolate con un elettrone e vuote, separate da un intervallo di energia. Gli stati energetici vicini al gap avranno un momento magnetico orbitale molto più significativo del magnetone di Bohr. Questo momento magnetico, generato dal moto degli elettroni attorno alla circonferenza del tubo, è stato proposto essere all'origine della suscettività magnetica dei nanotubi di carbonio.<sup>216,218</sup> Di fatto, i nanotubi di carbonio risultano avere una suscettività magnetica di orientamento media per carbonio maggiore rispetto a qualsiasi altra forma allotropica di carbonio elementare.<sup>219</sup>

#### 4.6.2.4. Addotti paramagnetici tra complessi di Gd(III) e MWCNTs.

Si calcola la relassività degli addotti MWCNTsCOOH-Gd(III)DOTAmaEtilendiamminaPirene (80) e MWCNTsUS-Gd(III)DOTAmaPegPirene (82) usando come bianchi MWCNTsCOOH, MWCNTs-US e l'addotto diamagnetico di La 83. Come nei casi precedenti si applica il fattore di correzione ottenuto dallo spettro UV-visibile.

<sup>216</sup> Glenis, S.; Likodimos, V.; Guskos, N.; Lin, C. L. Magnetic properties of multiwall nanotubes. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2004**, *272*, 1660-1661.

<sup>218</sup> Minot, E. D.; Yaish, Y.; Sazonova, V.; Mceuen, P. L. Determination of electron orbital magnetic moments in carbon nanotubes. *Nature* **2004**, *428* (6982), 536-539.

<sup>219</sup> Ramirez, A. P.; Haddon, R. C.; Zhou, O.; Fleming, R. M.; Zhang, J.; McClure, S. M.; Smalley, R. E. Magnetic-Susceptibility of Molecular Carbon - Nanotubes and Fullerite. *Science* **1994**, *265* (5168), 84-86.

### Addotto Gd(III)DOTAmaEtilendiamminaPirene 80

Il fattore di correzione ottenuto dai dati UV è riportato nella tabella seguente:

**Tabella 4.32.** Calcolo di FC per il calcolo della rilassività tra MWCNTs-COOH e l'addotto 80

	Addotto 80 4.9 mg/mL	MWCNTsCOOH 5 mg/mL	FC	FC Medio	STD
$\lambda$ nm	FD 100	FD 50		1.895	0.173
400	1.296	1.41	1.838		
450	1.162	1.222	1.902		
500	1.066	1.106	1.928		
550	0.982	1.021	1.924		
600	0.924	0.981	1.884		

Nel caso degli addotti paramagnetici il calcolo di  $r_{1p}$  ad ogni campo magnetico misurato si otterrà introducendo nell'Equazione 4.9 il bianco tenendo conto del fattore di correzione:

$$r_{1p} = \frac{\{R_{1oss} - [(R_{1b} - 0.38) * FC + 0.38]\}}{[Gd]} \quad \text{Equazione 4.9}$$

Dove  $R_{1b}$  è il valore di  $R_{1oss}$  del nanotubo che viene considerato come bianco, 0.38 è  $R_{1oss}$  dell'acqua, FC il fattore di correzione e  $[Gd]$  la concentrazione di Gd nell'addotto studiato.

La concentrazione di Gd dell'addotto 80 è stata determinata con i metodi descritti prima (digestione cloridrica e metodo Evans) e il valore utilizzato nel calcolo di  $r_{1p}$  è la media tra i due valori ottenuti.

**Tabella 4.33.** Determinazione della concentrazione di Gd(III) nell'addotto 80

Campione	Digestione con HCl	Evans	Media
Gd(III)DOTAmaEtilendiamminaPirene-MWCNTsCOOH 80	0.88	1.1	1±0.1

Facendo riferimento al campione di MWCNTsCOOH (5mg/mL) come bianco, si è quindi ottenuto il profilo NMRD dell'addotto 80 in termini di rilassività qui di seguito mostrato:

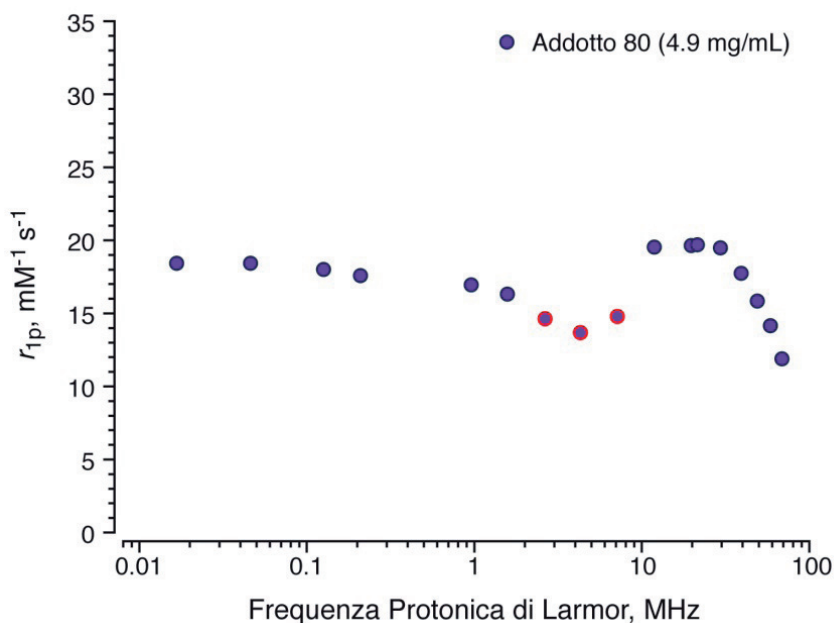


Figura 4.77. Profilo NMRD dell'addotto 80

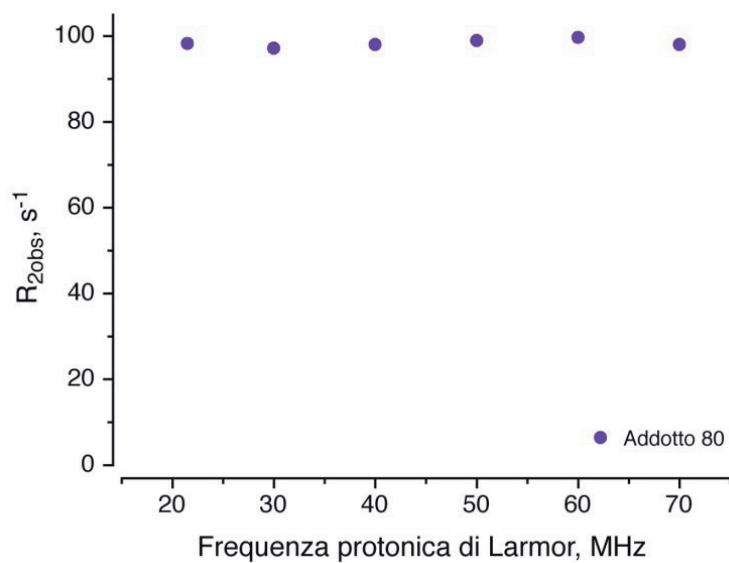
Considerando i limiti della teoria della rilassività di Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM) per sistemi di grandi dimensioni con lenti moti di rotazione, dei profili NMRD sono stati fittati solo i dati relativi alla regione del picco di rilassività. Il modello di Lipari-Szabo<sup>50,220</sup> è stato incorporato nella teoria SBM per tener conto sia delle rotazioni molecolari locali dei chelati intorno ad un braccio della loro struttura (descritte da  $\tau_l$ ) sia del moto globale dell'addotto ( $\tau_g$ ).

Nonostante queste premesse, non è stato possibile ottenere il fitting del profilo NMRD dell'addotto 80 perchè il modello si è dimostrato inadeguato.

La figura che segue mostra i dati di  $R_{2obs}$  a 25°C, che risultano costanti nell'intervallo di campi magnetici studiati.

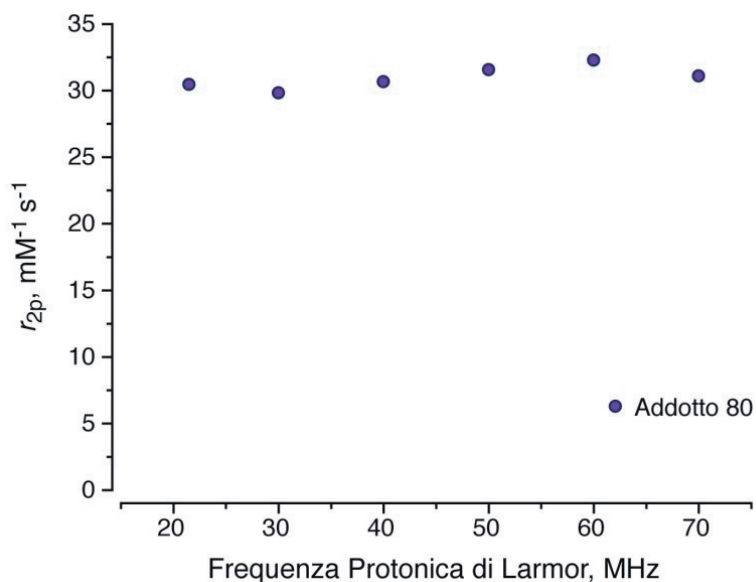
<sup>50</sup> Lipari, G.; Szabo, A. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .1. Theory and Range of Validity. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, *104* (17), 4546-4559.

<sup>220</sup> Lipari, G.; Szabo, A. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .2. Analysis of Experimental Results. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, *104* (17), 4559-4570.



**Figura 4.78.**  $R_{2obs}$  a 25°C del'addotto 80.

I valori di  $r_{2p}$  vengono calcolati utilizzando come bianco il valore medio di  $R_{2oss}$  del campione MWCNTs-COOH nell'intervallo di campi magnetici compreso tra 21.5 e 70 MHz (dove l'andamento è lineare) e tenendo conto del fattore di correzione ottenuto dai dati UV,  $FC = 1.895$ . Il valore medio di  $r_{2p}$  per l'addotto 80 è  $r_{2p} = 30.97 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



**Figura 4.79.**  $r_{2p}$  dell'addotto 80 a 25°C.

### Addotto Gd(III)DOTAmaPegPirene 82

Nel caso dell'addotto **82** sono stati calcolati due profili NMRD in termini di rilassività, a seconda del bianco utilizzato: il corrispondente addotto diamagnetico **83** o una sospensione di nanotubi frammentati con gli ultrasuoni MWCNTs-US.

Il fitting è stato realizzato solo per i dati ottenuti usando come bianco MWCNTs-US, dato che l'addotto diamagnetico **83** presenta una diversa concentrazione di complesso di La(III) rispetto alla concentrazione di complesso di Gd(III) nell'addotto **82**, dato ottenuto dai risultati di TXRF. Il diverso grado di caricamento potrebbe influire sull'impaccamento condizionando la rilassività.

La concentrazione di Gd(III) nei campioni analizzati è stata determinata attraverso digestione con HCl e successiva misura rilassometrica, con il metodo Evans, e al TXRF.

Sono stati studiati due campioni di addotto **82** a concentrazioni diverse, i dati sono di seguito riportati.

**Tabella 4.34.** Determinazione della concentrazione (mM) dell'addotto **82**

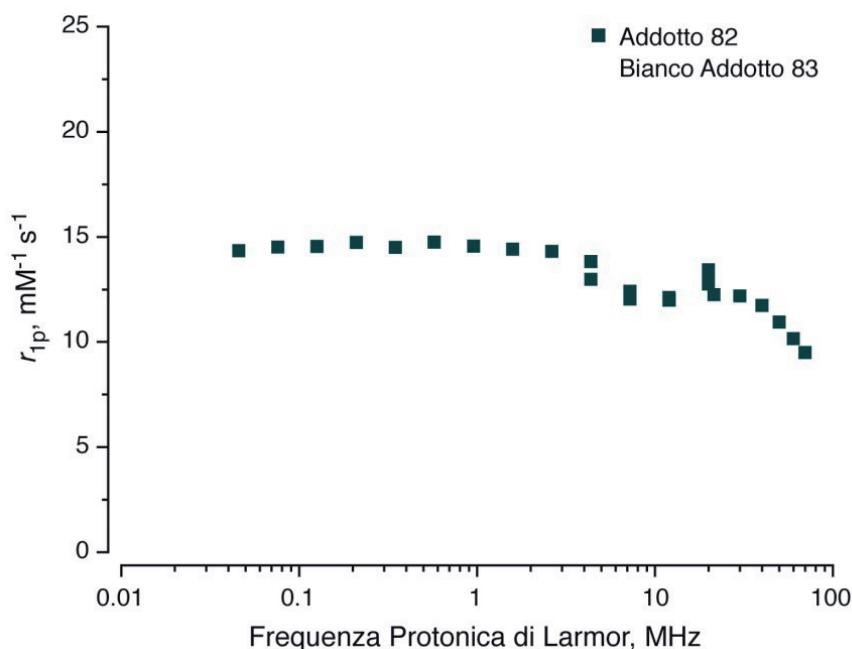
Campione	Digestione con HCl	Evans	TXRF	Media
<b>82</b> (4.9 mg/mL)	2.4	2.6 ±0.1		2.5
<b>82</b> (1 mg/mL)	0.46	0.5	0.47 Gd (III)	0.5
<b>83</b> (1 mg/mL)			0.14 La (III)	

Il fattore di correzione da considerare nell'elaborazione dei dati del profilo NMRD viene calcolato dai dati UV-visibile rispetto ai due diversi bianchi. Quando si utilizza come bianco l'addotto **83** FC viene calcolato secondo i dati UV-visibile riportati nella **Tabella 4.35** seguente:

**Tabella 4.35.** Calcolo di FC per l'addotto **82** e per l'addotto diamagnetico **83**

	Addotto 83 5 mg/mL	Addotto 82 1 mg/mL	FC	FC 82 (5mg/mL)	FC Medio
$\lambda$ nm	FD 100	FD 10			1.684
400	0.775	0.919	8.433	1.687	
450	0.669	0.795	8.415	1.683	
500	0.614	0.727	8.446	1.689	
550	0.562	0.672	8.363	1.673	
600	0.534	0.633	8.436	1.687	

Tenendo conto di FC (1.684) e della concentrazione di Gd(III) determinata prima, si calcola il profilo NMRD usando come bianco l'addotto diamagnetico di La(III) **83**, che viene qui mostrato:



**Figura 4.80.** Relassività dell'addotto **82** calcolata usando come bianco l'addotto diamagnetico di La(III) **83**.

Il fattore di correzione calcolato utilizzando come bianco MWCNTs-US è mostrato nella **Tabella 4.36**:

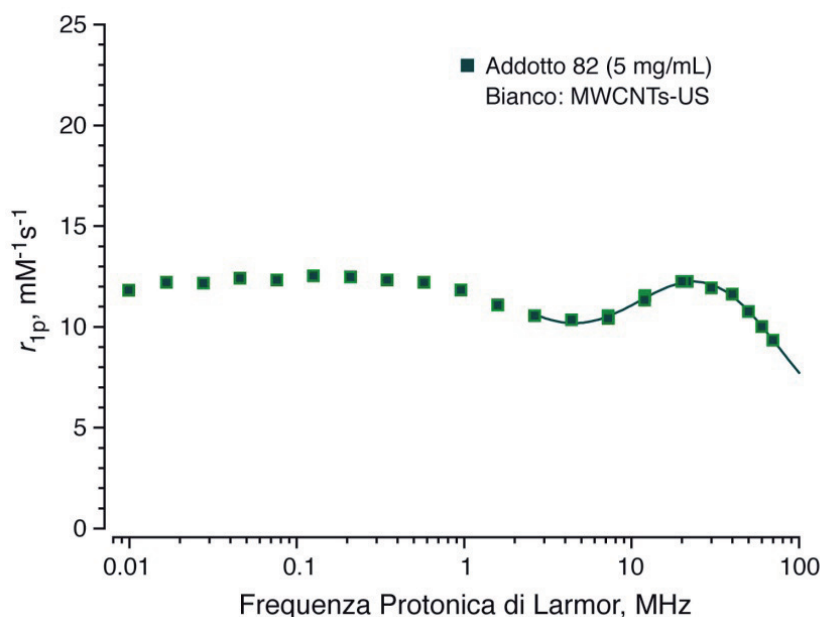
**Tabella 4.36.** Calcolo di FC per l'addotto **82** e MWCNTs-US

	MWCNTs-US (1 mg/mL)	Addotto 82 (1 mg/mL)	FC 82 (1mg/mL)	FC 82 (5mg/mL)	FC Medio
$\lambda$ nm	FD 30	FD 10			0.681
400	1.034	0.919	3.375	0.675	
450	0.917	0.795	3.460	0.692	
500	0.828	0.727	3.417	0.683	
550	0.763	0.672	3.406	0.681	
600	0.711	0.633	3.370	0.674	

Il profilo rilassometrico, riportato nella **Figura 4.81** è stato calcolato dai dati relativi all'addotto **82** (4.9 mg/mL) la cui concentrazione di [Gd] è pari a 2.5 mM, applicando il FC sopra calcolato di 0.681.



Il profilo è stato fittato solo nella regione ad alti campi utilizzando il modello di Lipari-Szabo<sup>50,220</sup>



**Figura 4.81.** Profilo NMRD addotto 82

Paragonando i due profili in **Figura 4.80** e **Figura 4.81** si può notare la differenza dovuta all'utilizzo dei due diversi bianchi, per un effetto della diversa concentrazione dei nanotubi e/o per un effetto di diverso impaccamento a seconda del grado di caricamento del complesso.

Nella procedura di fitting, i parametri legati ai tempi di rilassamento elettronico  $T_{1, 2e}$  ( $\Delta^2$ ,  $\tau_v$ ),  $\tau_g$  e  $\tau_l$ , e il parametro di ordine  $K^2$ , che ne descrive il grado di correlazione, vengono trattati come parametri variabili. Ai parametri  $\tau_v$  e  $\tau_M$  si impongono invece dei vincoli di variabilità derivanti dalla precedente caratterizzazione rilassometrica del complesso in soluzione. Si ottengono i seguenti parametri:

<sup>50</sup> Lipari, G.; Szabo, A. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .1. Theory and Range of Validity. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, 104 (17), 4546-4559.

<sup>220</sup> Lipari, G.; Szabo, A. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .2. Analysis of Experimental Results. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, 104 (17), 4559-4570.

**Tabella 4.37.** Parametri ottenuti dal fitting del profilo NMRD dell'addotto **82**

Campione	$\Delta^2$ $10^{19} \text{ s}^{-2}$	$\tau_v$ ps	$\tau_l$ Ps	$\tau_g$ ns	$K^2$	$\tau_M$ $\mu\text{s}$	$a$ $\text{\AA}$	$D$ $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$
<b>82</b>	$0.66 \pm 0.8$	$26 \pm 2$	$152 \pm 112$	$3.3 \pm 1$	$0.52 \pm 0.06$	1	3.8	2.3

Il parametro  $\tau_l$  dà informazioni circa il movimento locale della libera rotazione del complesso sulla catena, mentre  $\tau_g$  è associato al movimento globale dell'addotto. Il parametro  $K^2$  correla questi due tempi e assume valori compresi tra 0 e 1. Nel caso in cui  $K^2$  sia prossimo a 1 pesa di più il movimento globale del sistema, mentre se  $K^2$  è vicino a 0 ha un ruolo più determinante il movimento locale. Nel caso dell'addotto **82** ciò che si osserva è un comportamento intermedio con  $K^2 = 0.52$ .

Per capire meglio il comportamento di questo sistema si registrano dei profili a temperatura variabile.

L'andamento della velocità di rilassamento di sfera interna (acqua legata al centro paramagnetico) di un sistema al variare della temperatura dipende dal valore relativo di  $T_{1M}$ , il tempo di rilassamento dei protoni dell'acqua legata, e  $\tau_M$ , il tempo di permanenza dell'acqua legata, secondo la relazione:

$$R_{1oss} \propto \frac{1}{(T_{1M} + \tau_M)} \quad \text{Equazione 4.10}$$

Due casi limite sono possibili:

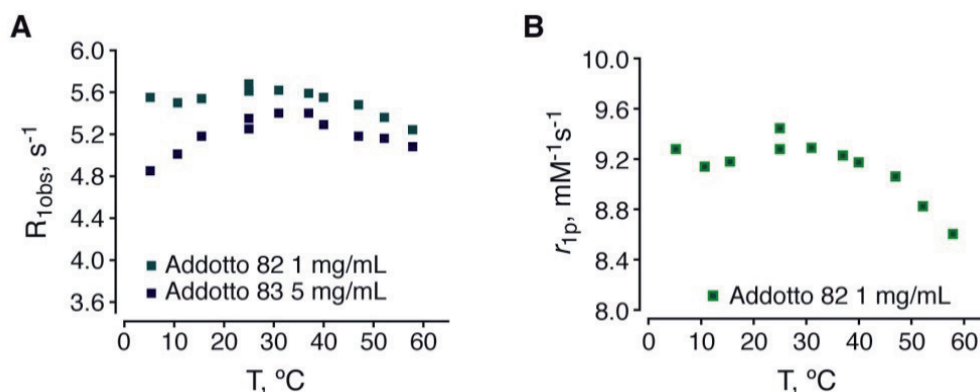
- $\tau_M < T_{1M}$  (regime di scambio veloce) dove l'andamento è dominato dalla dipendenza dalla temperatura di  $T_{1M}$ , che decresce al decrescere della temperatura perchè il tempo di correlazione  $\tau_C$  si allunga (valori più lunghi di  $\tau_R$  e  $T_{1,2e}$ ) ed  $R_{1oss}$  cresce.

- $\tau_M \geq T_{1M}$  (regime di scambio lento/intermedio) dove  $R_{1obs}$  decresce al decrescere della temperature, seguendo la crescita di  $\tau_M$ .

Il passaggio al variare della temperatura da una crescita di  $R_{1obs}$  ad una sua decresita dà luogo a delle curve con andamento a campana.

Si riportano nelle figure a seguire i valori di  $R_{1obs}$  al variare della temperatura (tra 5 e 58 °C circa) dell'addotto paramagnetico **82** con

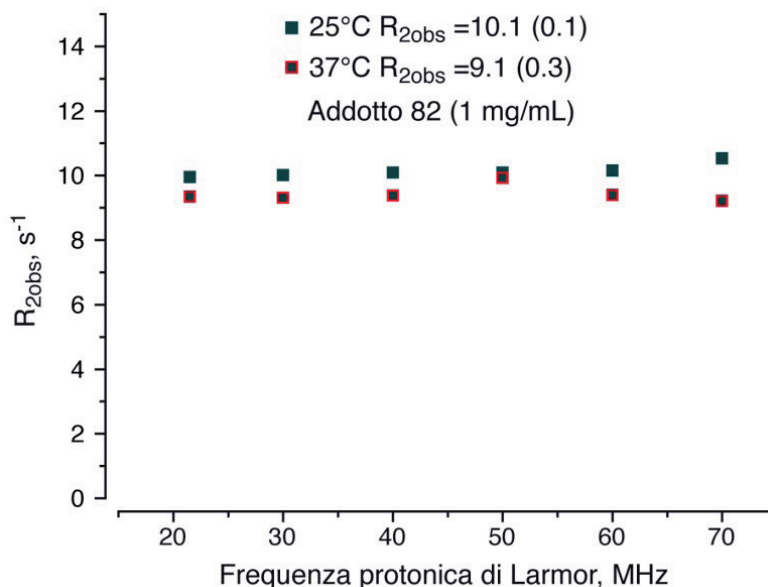
l'addotto diamagnetico **83** (Figura 4.82 A) e  $r_{1p}$  calcolata usando come bianco **83**. (Figura 4.82 B), a 21.5 MHz.



**Figura 4.82.** A:  $R_{1obs}$  degli addotti **82** e **83** a temperatura variabile. B.  $r_{1p}$  di **82** a temperatura variabile.

Nell'intervallo di temperatura studiato, l'andamento di  $r_{1p}$  dell'addotto **82** presenta una piccola variazione ad indicare che ci si trova in una situazione in cui  $\tau_M$  e  $T_{1M}$  sono simili, probabilmente a causa delle dimensioni dei nanotubi.  $T_{1M}$  è infatti proporzionale a  $\tau_R$ , il tempo di riorientazione molecolare che dipende dal raggio idrodinamico della specie.

Si calcolano i valori di  $R_2$  di un campione a concentrazione 1mg/mL dell'addotto **82**, a seguire si mostrano i dati di  $R_{2obs}$  a 25 e 37°C, che risultano costanti nell'intervallo di campi magnetici studiati.



**Figura 4.83.**  $R_{2obs}$  a 25 e 37°C dell'addotto **82**.

I valori di  $r_{2p}$  vengono calcolati utilizzando come bianco  $R_{2obs}$  medio di MWCNTs-US, dato che l'andamento nell'intervallo di campi magnetici compreso tra 21.5 e 70 MHz è lineare tenendo conto del fattore di correzione ottenuto dai dati UV,  $FC=0.681$ . Il valore medio di  $r_{2p}$  ottenuto è di  $r_{2p}=23.77 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

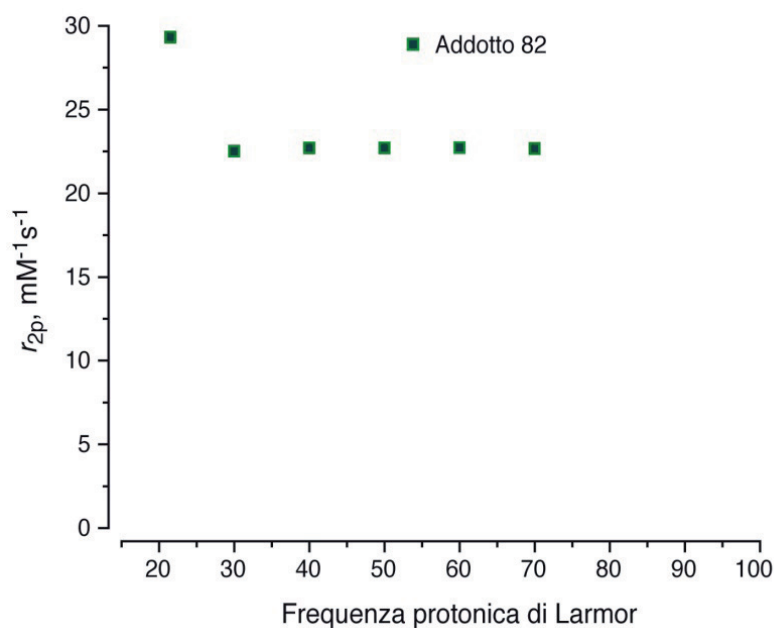


Figura 4.84.  $r_{2p}$  addotto **82** a 25°C.

### Paragone tra gli addotti **80** e **82**

Anche nel caso degli addotti **80** e **82** risulta utile riportare i dati TXRF che mostrano il contenuto metallico degli addotti studiati:

Tabella 4.38. Contenuto metallico percentuale degli addotti **80** e **82** determinato con TXRF

Campioni	Metalli mg/mL (%)				
	Gd	Fe	Co	Ni	Zn
Addotto <b>80</b>	1.62	0.02	ND	0.003	0.01
Addotto <b>82</b>	7.53	0.02	0.05	0.01	0.03

Il contenuto metallico dei due addotti è paragonabile, differisce di molto la concentrazione di Gd, che risulta maggiore nell'addotto **82**.

Analizzando i profili NMRD degli addotti paramagnetici **80** e **82**, si osserva come l'addotto con il complesso paramagnetico più piccolo

(Gd(III)DOTAmaEtilendiamminaPirene **21**) presenti valori di  $r_{1p}$  più elevati rispetto all'addotto **82**, caricato con l'addotto **22b** (Gd(III)DOTAmaPegPirene) più grande, questo effetto è dovuto al fatto che l'addotto è più immobilizzato e il moto locale del complesso **21** risulta inferiore a quello di **22b** rispetto all'addotto totale (Figura 4.85).

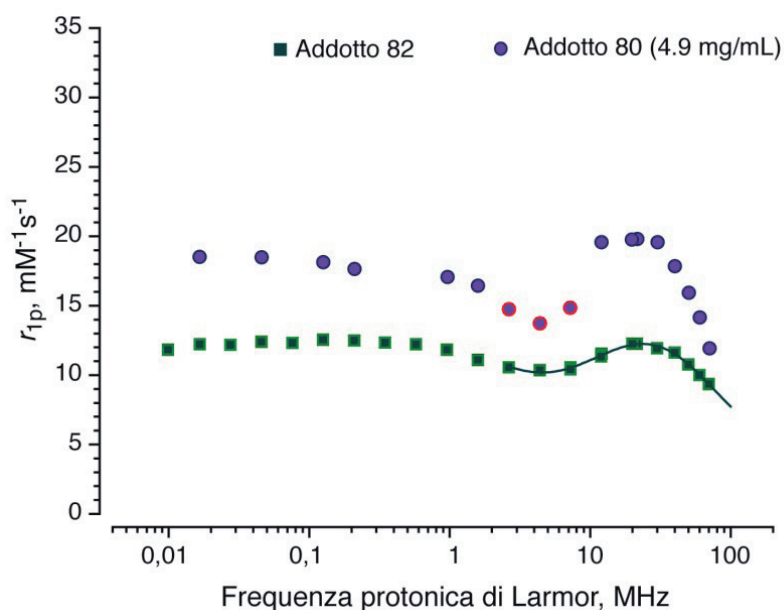


Figura 4.85. Profili NMRD addotti **80** e **82**.

Anche nel caso di  $r_{2p}$  i valori più elevati si riscontrano nel caso dell'addotto **80**.

**Tabella 4.39.** Rapporti tra  $R_2$  e  $R_1$  dei complessi **21** e **22b**, dei nanotubi **MWCNTs-US** e **MWCNTsCOOH** e degli addotti **80** e **82** rispetto a **MWCNTs-US**, a 21.5 MHz, a 25°C

Campioni	$R_{1obs} (s^{-1})$	$R_{2obs} (s^{-1})$	$r_{1p} mM^{-1} s^{-1}$	$r_{2p} mM^{-1} s^{-1}$	Ratio $r_{2p}/r_{1p}$
Complesso <b>21</b>	0.75	0.86	4.60	4.99	1.08
<b>MWCNTsCOOH</b> 5 mg/mL + P2%/FC	3.74	16.27			
Addotto <b>80</b> /FC	8.78	23.89	20.76	30.44	1.47
Complesso <b>22b</b>	3.89	4.67	6.38	7.09	1.11
<b>MWCNTs-US</b> +P2%	2.94	16.95			
Addotto <b>82</b> *FC	23.27	57.87	12.24	29.32	2.40

La Tabella 4.39 riporta i valori di  $R_1$  e  $R_2$  osservati, i valori di  $r_{1p}$  e  $r_{2p}$  e i rapporti tra  $R_2/R_1$  a 21.5 MHz a 25 °C dei complessi di Gd(III) **21** e **22b**, dei nanotubi ossidati MWCNTsCOOH e frammentati con gli ultrasuoni MWCNTs-US e degli addotti paramagnetici **80** e **82**.

I valori di  $r_{1p}$  e di  $r_{2p}$  del complesso **22b** DOTAmPegPirene (6.4 e 7.1 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) sono superiori a quelli di **21** DOTAmEtilendiamminaPirene (4.6 e 5 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) e questo è dovuto principalmente al maggior peso molecolare del complesso **22b** che presenta un tempo di correlazione rotazionale  $\tau_r$  maggiore, influenzando in tal modo sulla rilassività del sistema.

Nel caso dei nanotubi, come è stato commentato precedentemente, i nanotubi ossidati (MWCNTsCOOH) presentano valori di  $R_{10ss}$  maggiori dei frammentati con gli ultrasuoni e l'effetto è probabilmente dovuto alla presenza di impurezze paramagnetiche ed a diversi difetti sulla superficie del nanotubo che, come è stato citato prima, danno luogo a momenti magnetici locali. Inoltre, le dimensioni più ridotte dei MWCNTsCOOH potrebbero dare impaccamenti diversi con conseguenze sulla diffusione dell'acqua e sulla loro mobilità. La diversità tra i due tipi di nanotubi emerge anche dal paragone tra i valori del rapporto  $r_{2p}/r_{1p}$ : 6.3 nel caso di MWCNTs-US rispetto a 4.7 di MWCNTsCOOH.

Infine, per gli addotti si osserva un'inversione del comportamento rilassometrico rispetto ai complessi: l'addotto **80** presenta valori di  $r_{1p}$  maggiori dell'addotto **82**, essendo funzionalizzato con un complesso che, in seguito all'interazione con il nanotubo, riduce maggiormente la sua mobilità, essendo privo del lungo braccio PEG.

Dai dati riportati in tabella, è possibile osservare che gli addotti presentano valori di rilassività superiori rispetto ai complessi in soluzione, in linea con quanto atteso. L'aumento relativo per la rilassività trasversale è maggiore rispetto a quella longitudinale. Questo è dovuto al fatto che il complesso di gadolinite, adeso alla superficie del nanotubo, porta due contributi a  $R_{2obs}$ : il contributo paramagnetico (simile a quello che si può osservare per  $R_{1obs}$ ) ed un ulteriore contributo derivante dalla suscettività magnetica complessiva della specie complesso di gadolinio-nanotubo.

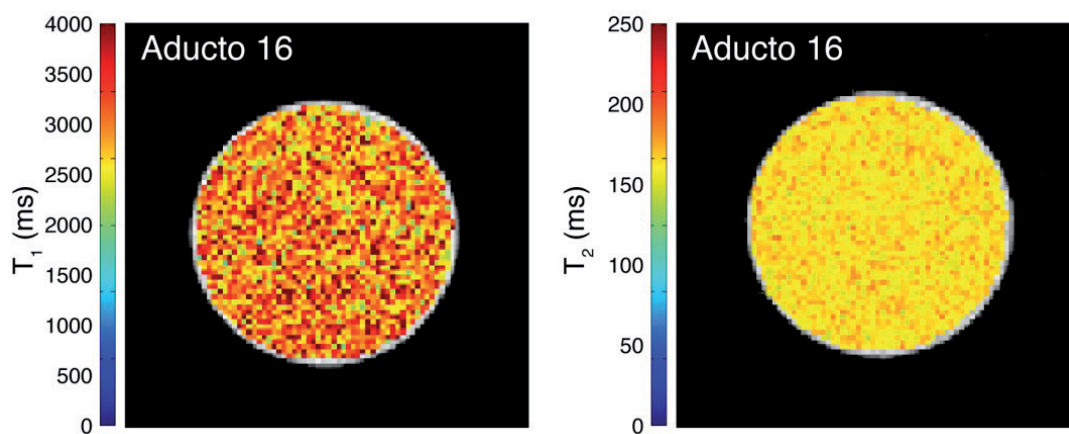
Osservando il rapporto  $r_{2p}/r_{1p}$ , questo diminuisce passando dalla specie nanotubo alla specie addotto, essendo uguale a 1.47 per l'addotto 80 e 2.40 per l'addotto 82, che possono quindi essere considerati dei discreti agenti di rilassamento  $T_1$ .

Confrontandoli in termini di rilassività, l'addotto 80 sembra essere più promettente, risulta però essere meno solubile dell'addotto 82 in acqua a  $\text{pH} \sim 7.2-7.4$ , proprio a causa dell'assenza del polietilen glicol nello scheletro del complesso.

### 4.6.3. Imagen por Resonancia Magnética

#### 4.6.3.1. Mapas de $T_1$ y de $T_2$

Se han obtenido los mapas de  $T_1$  y de  $T_2$  a 300 MHz y a 22 °C de tres cortes de una suspensión acuosa ( $10^{-3}$  mg/mL) del Aducto 16 MWCNTs-COOH-AP (Figura 4.86).



**Figura 4.86.** Mapas de  $T_1$  (izq) y de  $T_2$  (dcha) de una suspensión acuosa ( $10^{-3}$  mg/mL) de aducto 16 AP-MWCNTs.

La **Tabla 4.40** muestra los valores de  $R_{1obs}$  y  $R_{2obs}$  del aducto 16. Se observa un valor elevado de  $R_{2obs}$  debido a la presencia de los nanotubos.

**Tabla 4.40.** Valores de  $R_{1o}$  y  $R_{2o}$  del aducto 16 AP-MWCNTs

	$R_{1obs}$	$R_{2obs}$	Ratio $r_{2o}/r_{1o}$
AP-MWCNTs (16)	0.35	6.18	6.43

Se han registrado los mapas de  $T_1$  y de  $T_2$  a 300 MHz y a 22 °C de los complejos de Gd(III) 21 y 22b y de los aductos de La (III) 83, de Gd (III) 80 y 82 correspondientes con el objeto de analizar estos parámetros a campos altos y observar la homogeneidad de las muestras estudiadas. La concentración de Gd(III) en las muestras se ha calculado bien empleando el método Evans, descrito en el apartado 4.6.2, o bien por TXRF.

A modo de ejemplo se muestran algunos mapas de  $T_1$  de los aductos 80 y 82 que corroboran la homogeneidad de las muestras estudiadas.



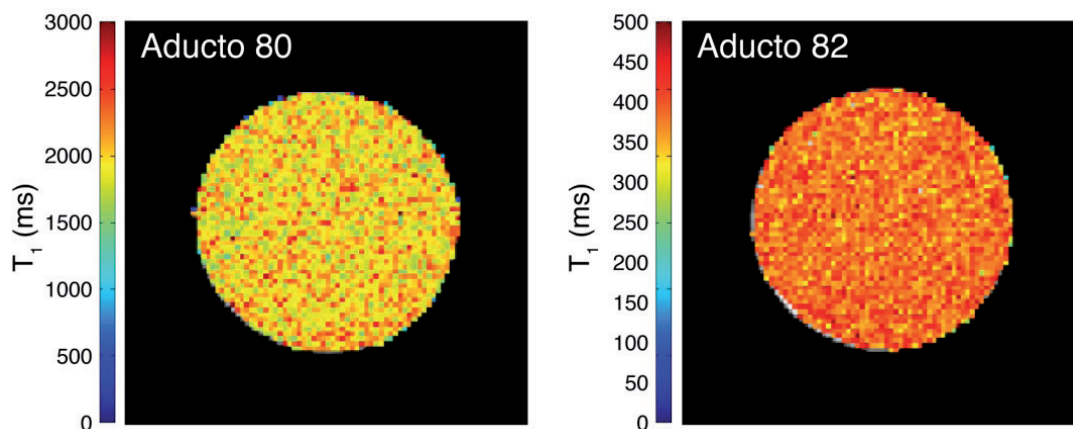


Figura 4.87. Mapas de  $T_1$  a 300 MHz de los aductos 80 (izda) y 82 (dcha)

En el cálculo de la relajatividad, tanto longitudinal como transversal solo se ha tenido en cuenta la contribución diamagnética del agua a diferencia de como se ha hecho en el apartado 4.6.2 donde se tenía en cuenta de la contribución de los nanotubos. De esta forma no son cuantitativamente comparables los datos obtenidos en ambos casos, pero sí resultan útiles para establecer una línea de tendencia de los valores de relajatividad a altos campos. En el gráfico de barras mostrado a continuación (Figura 4.88), podemos observar como los valores observados: en el caso del complejo de Gd(III) 21 disminuyen ligeramente (4.6 a 21.5 MHz), así como para el complejo 22b bajan de 6.4 a 21.5 MHz y a  $3.9 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$  a 300 MHz. En el caso de los aductos el que presenta mayor relajatividad es el 82.

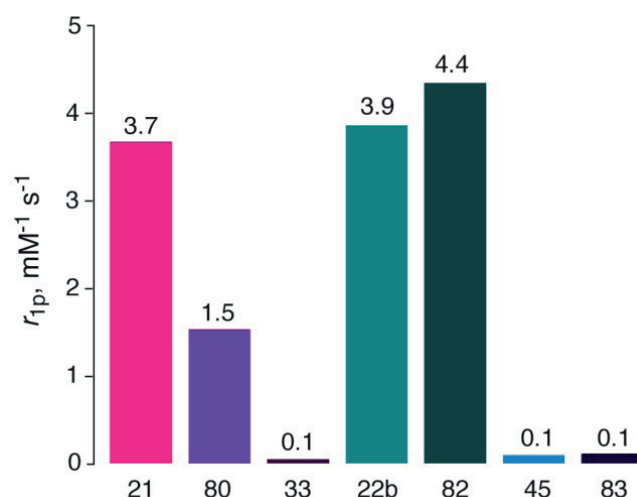
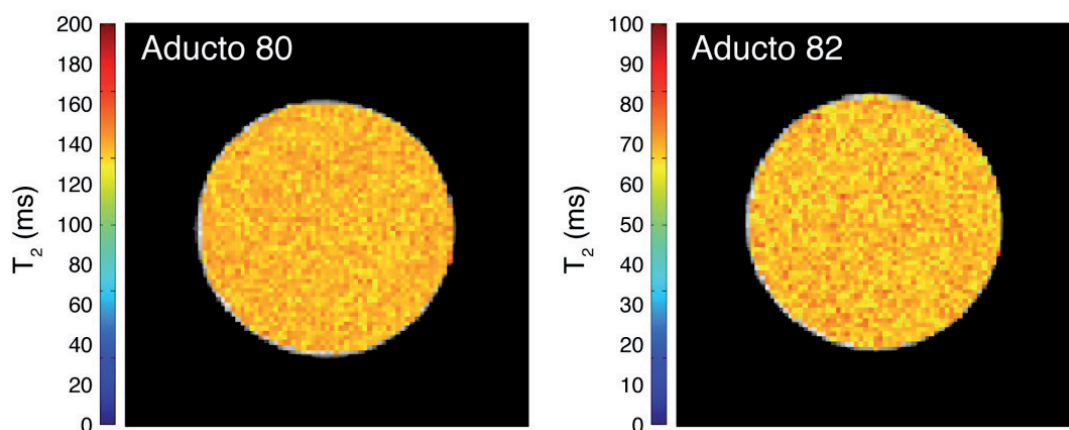


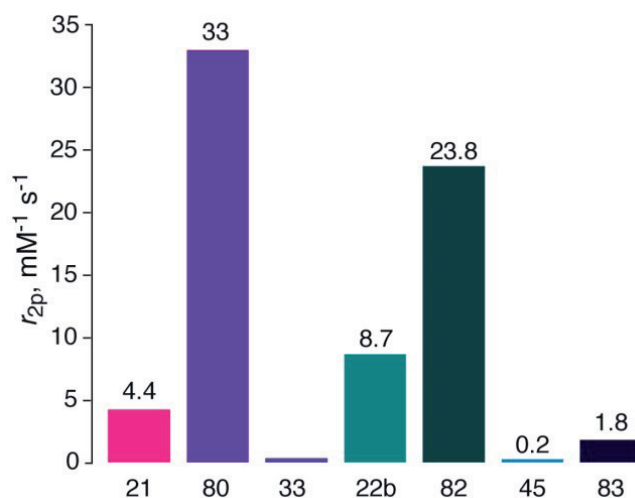
Figura 4.88.  $r_{1p}$  de las muestras estudiadas a 300 MHz, teniendo en cuenta solo de la contribución diamagnética del agua.

También se muestran los mapas de  $T_2$  de los aductos 80 y 82 a 300 MHz.



**Figura 4.89.** Mapas de  $T_2$  a 300 MHz de los aductos 80 (izda) y 82 (dcha)

A altos campos los valores de  $r_2$  para los aductos siguen siendo elevados, de  $33.0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  para el aducto 80 y  $23.8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  para el aducto 82 confirmando el hecho que se había observado en los perfiles NMRD.



**Figura 4.90.**  $r_{2p}$  de las muestras estudiadas a 300 MHz, teniendo en cuenta solo de la contribución diamagnética del agua.

También se ha analizado la relación  $r_{1p}/r_{2p}$ , que se muestra en la Tabla 4.41 y en presencia de los aductos de nanotubos de carbono se observa como el valor de  $r_{2p}$  es muy superior a  $r_{1p}$ .

**Tabla 4.41.** Relación  $r_{2p}/r_{1p}$  de las muestras analizadas.

Compuesto	$r_{1p}$ ( $s^{-1}mM^{-1}$ ) vs $H_2O$	$r_{2p}$ ( $s^{-1}mM^{-1}$ ) vs $H_2O$	$r_{2p}/r_{1p}$
Complejo <b>21</b>	3.7	4.4	1.19
Aducto <b>80</b> (1 mg/mL)	1.5	33.0	22.00
Complejo <b>22b</b>	3.9	8.7	2.25
Aducto <b>82</b> (1 mg/mL)	4.4	23.8	5.45
Aducto <b>83</b> (1 mg/mL)	0.1	1.8	15.29

En este sentido cabe resaltar el importante incremento en la relación  $r_{2p}/r_{1p}$  que muestran los aductos 80 y 82, que implica un incremento significativo del comportamiento superparamagnético al formarse el aducto.

#### 4.6.3.2. Mapas de coeficiente de Difusión Aparente (ADC)

Se han adquirido imágenes potenciadas en difusión (tres cortes y tres direcciones ortogonales por cada corte) y mapas de ADC de diferentes sistemas. Se ha registrado el mapa de ADC del agua para poderlo comparar con los mapas de los compuestos obtenidos.

Se ha estudiado la difusión del agua en una disolución del aducto AP-MWCNTs. Posteriormente se ha obtenido el mapa de ADC de todos los complejos obtenidos, tanto de La(III) como de Gd(III) y de los correspondientes aductos. Estos datos permiten confirmar los resultados previos<sup>164</sup> obtenidos con los mapas de ADC de una suspensión de SWCNTs oxidados durante 24 horas, mostrados en el apartado 4.2.1.2, que indicaban una difusión preferencial del agua en la dirección H-F paralela al campo magnético  $B_0$  aplicado. Concretamente, se han estudiado los siguientes compuestos:

- agua
- aducto AP-MWCNTs (16)
- derivados de DOTAmEtilendiaminaPireno:
  - complejo de Gd (III) (21)
  - complejo de La (III) (33)

<sup>164</sup> Negri, V.; Cerpa, A.; Lopez-Larrubia, P.; Nieto-Charques, L.; Cerdan, S.; Ballesteros, P. Nanotubular Paramagnetic Probes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging Based on the Diffusion Tensor. *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, *49*(10), 1813-1815.

- aducto entre los nanotubos oxidados y los complejos de Gd (aducto 80)
- derivados de DOTAmPegPireno:
  - complejo de Gd (III) (22b)
  - complejo de La (III) (45)
  - aducto entre los nanotubos fragmentados por ultrasonidos y el complejo de Gd (III) (aducto 82)
  - aducto entre los nanotubos fragmentados por ultrasonidos y el complejo de La (III) (aducto 83)

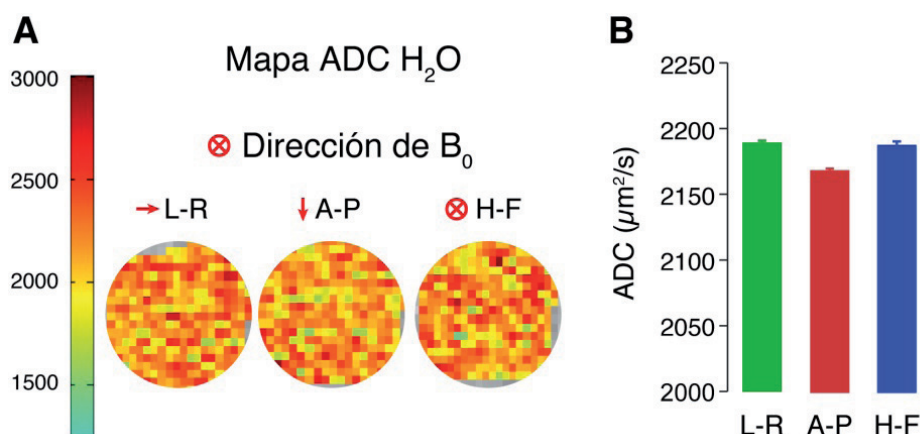
Los mapas de ADC se han obtenido procesando los datos con un software desarrollado en nuestro grupo de investigación basado en MatLab. Los datos procesados para la obtención de los gráficos de barras de cada dirección se han sometido a un test de outliers. Se ha empleado el test estadístico t de Student para hallar diferencias significativas entre los resultados obtenidos en las tres direcciones de los gradientes de difusión: left-right (L-R), antero-posterior (A-P) y head-foot (H-F) paralela a  $B_0$ . Los resultados se muestran en los gráficos de barras con asteriscos: tres cuando  $p \leq 0.001$ , dos cuando  $p \leq 0.01$  y uno cuando  $p \leq 0.05$ . Además del valor medio obtenido se muestra el error standard de la serie de datos analizada.

Lo que cabe esperar es observar anisotropía en los aductos que se manifiesta con una mayor difusión del agua en la dirección de  $B_0$  (H-F), debida a la orientación de los nanotubos en el campo magnético confirmando los resultados obtenidos anteriormente con los SWCNTs.

Los detalles experimentales, así como la secuencia empleada en la adquisición de los mapas se describen en el capítulo 6, apartado 6.8.3.

### Mapa de ADC del Agua

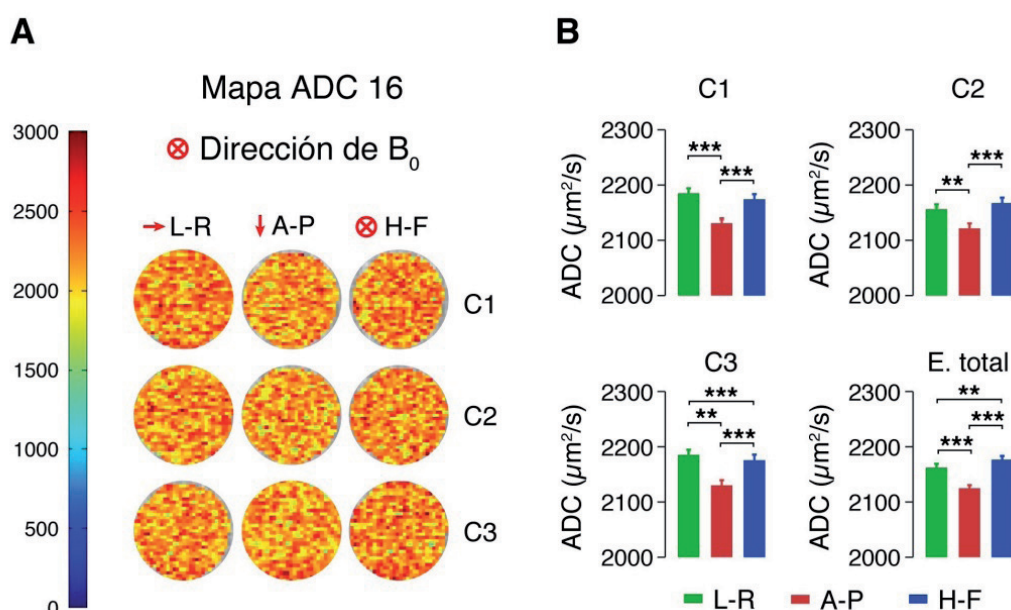
El mapa de ADC del disolvente agua (Figura 4.91 A) es típico de un medio isotrópico, teniendo valores promedios de cada dirección muy parecidos, claramente observables en el gráfico de barras (Figura 4.91 B) donde no aparecen diferencias significativas entre las tres direcciones de difusión.



**Figura 4.91.** Mapas de ADC del agua en las tres direcciones ortogonales (A) y gráfico de barras comparativo (B).

### Mapas de ADC del aducto AP-MWCNTs (16)

Se registran imágenes potenciadas en difusión de una disolución acuosa ( $10^{-3}$  mg/mL) del aducto AP-MWCNTs. La Figura 4.92 muestra los Mapas de ADC (A) y los gráficos de barras (B) obtenidos. No revelan una difusión preferencial del agua en una dirección con respecto a las demás. Esto indica que a temperatura ambiente, a la concentración estudiada no se observa difusión anisotrópica del agua en estos sistemas.

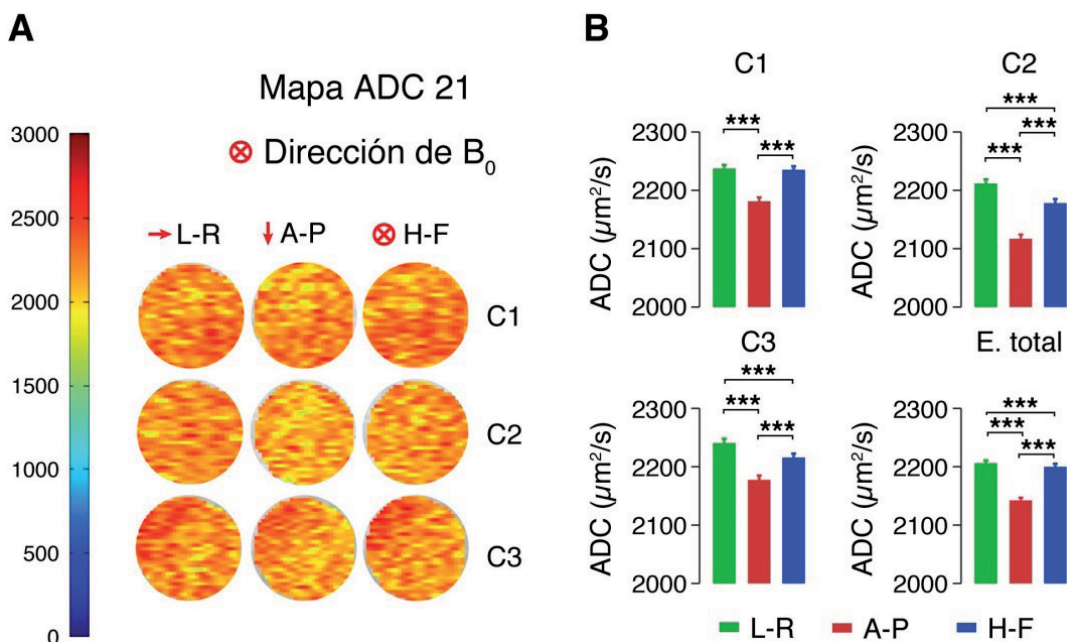


**Figura 4.92.** Mapas de ADC del aducto 16 AP-MWCNTs en las tres direcciones ortogonales (A), gráficos de barras (B) y estadística total.

Mapas de ADC de los complejos de Gd(III) 21 y 22b y del complejo de La(III) 45.

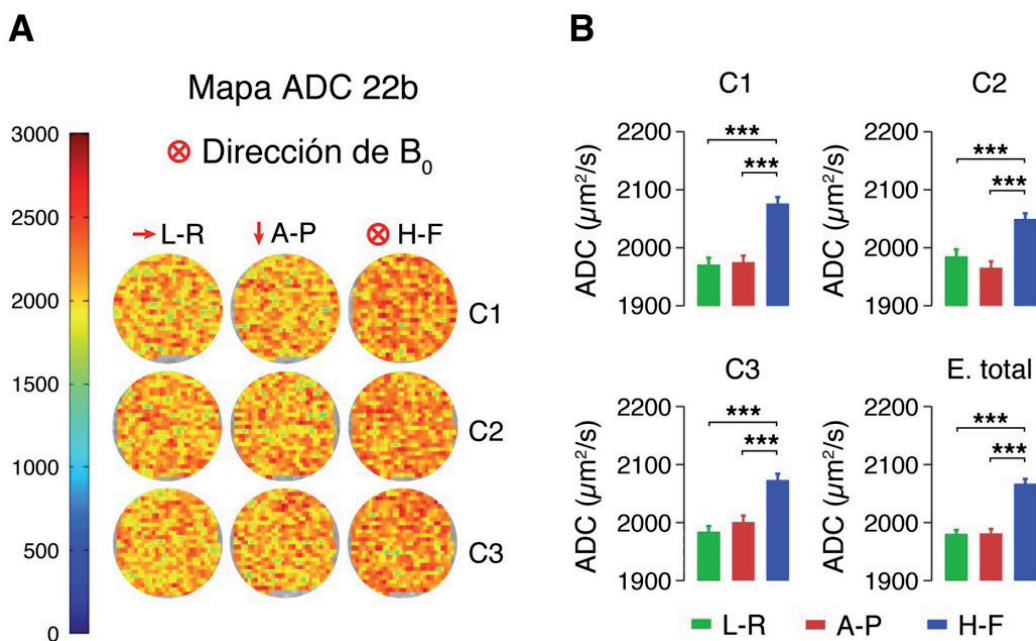
Se registran imágenes potenciadas en difusión de disoluciones de los complejos 21, 22b y 45 (a diferente concentración). Las figuras siguientes muestran ejemplos representativos de los mapas de ADC (panel A) obtenidos en las tres direcciones L-R, A-P, H-F. El panel B muestra los gráficos de barras correspondientes, además de un gráfico de barras donde se resumen todos los datos relativos a cada muestra. La Figura 4.93 A y B muestra los datos inherentes a una disolución 0.04 mM del complejo 21. Analizándolos no se observa un comportamiento anisotrópico de la muestra ya que no predomina claramente una dirección sobre las demás. Se observan diferencias significativas entre todas las direcciones.





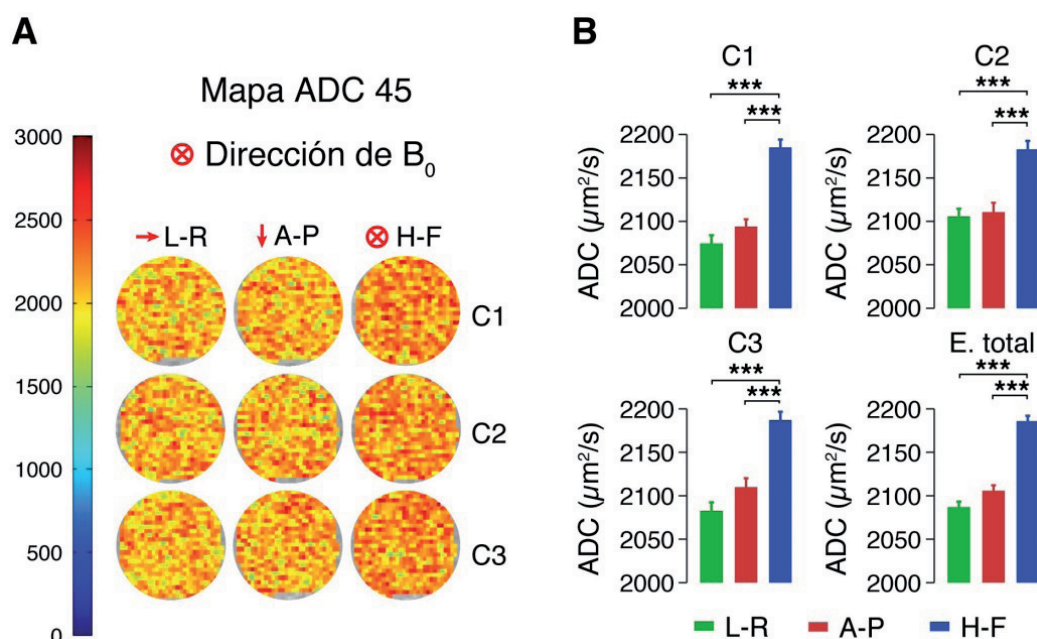
**Figura 4.93.** Mapa ADC de los tres cortes (A), gráficos de barra y estadística total (B) del complejo 21

Observando los mapas de ADC (**Figura 4.94 A**) y los gráficos de barras del complejo **22b** (**Figura 4.94 B**) (disolución 1.265 mM) se aprecia una difusión preferencial en la dirección H-F paralela del campo magnético. Este complejo, siendo más largo que el complejo **21**, y más concentrado, induce difusión preferencial en la dirección paralela al campo magnético.



**Figura 4.94.** Mapa ADC de los tres cortes (A), gráficos de barra y estadística total (B) del complejo 22b

Se observa el mismo efecto en el complejo de La (III) **45** (2.2 mM), donde el ligando es el mismo que el del complejo **22b** (Figura 4.95).



**Figura 4.95.** Mapa ADC de los tres cortes (A), gráficos de barras y estadística total (B) del complejo **45**.

En resumen los complejos derivados del ligando **44** DOTAmPegPireno, más largos, inducen difusión preferencial en la dirección H-F.

### Mapas de ADC de los aductos **80**, **82** y **83**

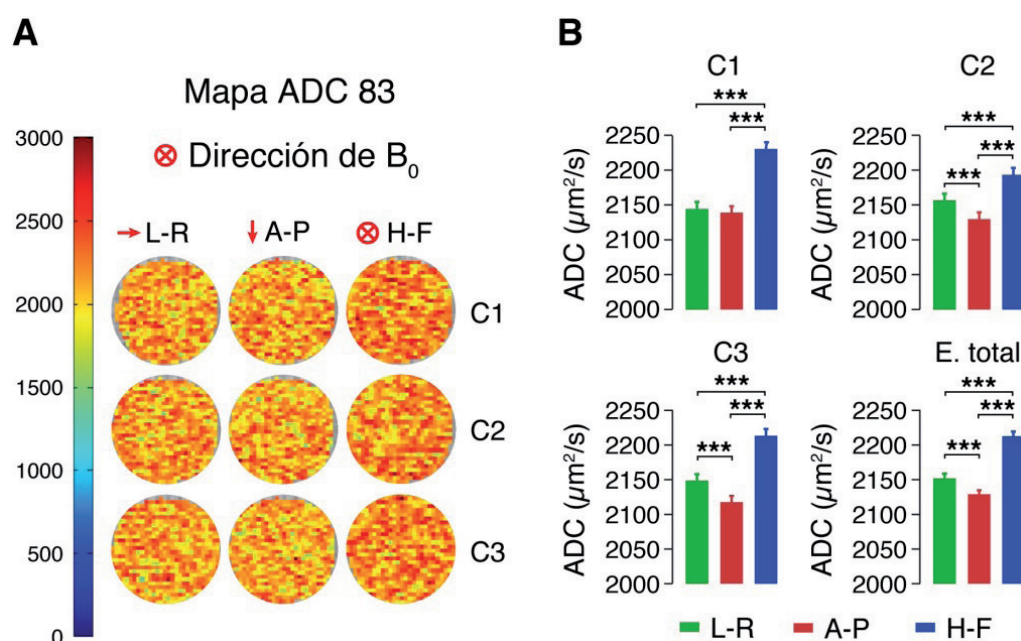
Se registran imágenes potenciadas en difusión de disoluciones 1 mg/mL de los aductos **80**, **82** y **83**. En las figuras a continuación se muestran los mapas de ADC (parte A) de los tres cortes en las tres direcciones L-R, A-P, H-F y del promedio de las tres direcciones y en la parte B los relativos gráficos de barras además de un gráfico resumen de todos los datos de cada muestra. En la **Figura 4.96** se muestran los datos del aducto **80**: se observa una clara difusión preferencial en la dirección H-F paralela a  $B_0$  que indica orientación de los nanotubos en el campo magnético.





Esto se atribuye a la contribución del complejo que, debido al polietilenglicol, ayuda a la orientación del nanotubo en el campo magnético.

Para el aducto **83** (Figura 4.98), se observa el mismo efecto que para el aducto **82**: hay difusión preferencial en la dirección H-F, confirmando una vez más la orientación de los nanotubos en el campo magnético.



**Figura 4.98.** Mapa ADC de los tres cortes (A), gráficos de barras y estadística total (B) del aducto **83**.

Finalmente, y antes de proporcionar las conclusiones, conviene resumir aquí los principales hallazgos de esta Tesis y su relación con los planteamientos que la originaron. En general, hemos proporcionado un nuevo entorno de modelización molecular que permite comprender mejor la naturaleza de las interacciones entre CNTs y moléculas aromáticas, y detectar la difusión anisotrópica del agua en presencia de CNTs. Además hemos desarrollado metodologías que permiten fragmentar los nanotubos comerciales, hasta longitudes que resultan compatibles con su utilización biomédica, caracterizando extensivamente los CNTs producidos. Se ha desarrollado un modelo de aducto soluble en agua que abre nuevas perspectivas en la derivatización de los CNTs y en el estudio de sus propiedades magneto-ópticas. Se han obtenido dos aductos por interacciones  $\pi-\pi$  solubles en agua: entre los complejos de Gd(III)

DOTAmaEtilendiamina pireno y MWCTsCOOH y entre Gd(III)DOTAmaPegPireno y MWCNTsUS. Los estudios de relajatividad muestran interesantes valores tanto de  $r_{1p}$  como de  $r_{2p}$ . La fluorescencia de los aductos obtenidos los hace prometedores de ser sondas duales tanto en MRI como en fluorescencia.

Finalmente, resaltar que estos aductos constituyen la primera generación de agentes de contraste nanotubulares capaces de modificar el tensor de difusión del agua, algo que podría permitir en el futuro, su utilización para establecer la orientación espacial de estas moléculas *in vivo*, mediante medidas de DWI, como propusimos al comenzar este trabajo.

## 5. Conclusiones

---

“Qualunque passo faccia la scienza lo può fare per qualcosa che non dipenda da essa. Quando uno fa una scoperta sente una gratitudine, prova una sorpresa, perchè nulla è inerte, tutto vive, tutto è atto di ringraziamento.”

Luigi Giussani



## CONCLUSIONES

Como conclusión general de esta Tesis Doctoral podemos indicar que se han cumplido los objetivos iniciales propuestos para el trabajo. Se han preparado nuevos ACs con propiedades magnéticas anisotrópicas basados en nanotubos de carbono y complejos de Gd (III) derivados de DOTA mono amida que podrían emplearse como sondas duales de imagen multimodal debidos a sus propiedades magnéticas y de fluorescencia.

1. Se han modelizado las interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre CNTs y derivados de pireno, y simulado la difusión traslacional del agua en suspensiones de CNTs. Los resultados de modelización molecular muestran que la interacción entre los nanotubos de carbono (6.6) y diferentes derivados de pireno, es de tipo  $\pi$ - $\pi$  y que la configuración más favorable es la paralela desplazada. Los resultados de dinámica molecular ponen de manifiesto que el agua dentro de los nanotubos se mueve más lentamente que el agua exterior, que el mecanismo de difusión del agua interna no sigue el modelo de Fick y que la difusión del agua es claramente anisótropa.

2. Se han preparado CNTs de longitud controlada mediante fragmentación por métodos oxidativos y ultrasonidos. Estas preparaciones se han caracterizado empleando una amplia batería de métodos físico-químicos.

2.1. SWCNTs: La estructura tubular de los SWCNTs se ha confirmado tanto por TEM como por espectroscopia Raman, obteniendo mapas de ADC por MRI que revelan una difusión anisotrópica del agua, inducida por alineamiento de los CNTs con el campo magnético  $B_0$ . Este alineamiento se ha confirmado obteniendo los ciclos de histéresis mediante SQUID, observando que la magnetización detectada es mayor en la dirección paralela que en la perpendicular a  $B_0$ . Los resultados de los ensayos de citotoxicidad, tanto MTT como LDH, de los SWCNTs no han revelado efectos citotóxicos significativos de las preparaciones en las concentraciones necesarias para efectos de anisotropía magnética observables.

2.2. MWCNTs: El estudio del tamaño de estos nanotubos fragmentados, realizado analizando las imágenes TEM, ha proporcionado un intervalo de longitudes entre 50 y 300 nm, ligeramente inferior en los oxidados. La funcionalización se ha confirmado por estudios de XPS, TGA y FT-IR.

3. Se ha obtenido un aducto por interacciones  $\pi-\pi$  entre MWCNTs y aminopireno que se ha empleado como modelo.

3.1. Los estudios de fluorescencia del aducto a diferentes pHs comparados con los del aminopireno solo, muestran los picos característicos del AP como monómero. El aducto disminuye la formación del excímero.

3.2. Los espectros de FT-IR con ATR confirman la funcionalización de los MWCNTs con AP.

3.3. Se han investigado los determinantes de la anisotropía magnética en preparaciones de nanotubos de carbono y se ha mostrado que el comportamiento anisotrópico depende del diámetro, de la longitud, de las inhomogeneidades de la nanoestructura y que también contribuyen las nanopartículas metálicas (Ni) presentes en los nanotubos.

4. Se han sintetizado y caracterizado cinco diferentes ligandos basados en DOTAm con una unidad de pireno, que varían en el espaciador entre el pireno y la jaula de coordinación del Gd (III) tales como: etilendiamina; diamino polietilenglicol; fenilo; bispropiletriamina y  $N^1,N^1$ -bis(2-aminoetil)etan-1,2-diamina (TREN). De los derivados de etilendiamina y diaminopolietilenglicol se han obtenido los correspondientes complejos diamagnéticos de La (III) y paramagnéticos de Gd (III).

5. Se han obtenido los aductos por interacciones  $\pi-\pi$  en agua entre MWCNTsCOOH y los complejos de Gd(III) y de La(III) de DOTAmEtilendiaminaPireno y entre MWCNTsUS y los complejos de Gd(III) y de La(III) DOTAmPegPireno.

6. Se han investigado las propiedades físico-químicas de los ligandos, complejos y aductos obtenidos.

6.1. Fluorescencia. En todos los sistemas estudiados se ha observado una fluorescencia característica del pireno monómero en disolventes polares que justifica su asociación preferencial con el MWCNT en el caso de los aductos, dificultando la formación del excímero.

6.2. Relajatividad. Los perfiles NMRD de los complejos paramagnéticos obtenidos muestran valores acordes con la estructura (DOTAma) y el tamaño molecular, en particular el derivado con Peg proporciona valores ligeramente superiores. Sin embargo en los aductos, los valores de mayor relajatividad pertenecen al derivado de etilendiamina, que da lugar a un aducto más compacto pero menos soluble.

6.3. Imagen por Resonancia Magnética. Los Mapas de  $T_1$  y de  $T_2$  a 300 MHz han revelado homogeneidad en las muestras y han confirmado el efecto en  $T_2$  de los CNTs. Los mapas de ADC han confirmado la difusión anisotrópica del agua en las preparaciones de los aductos, incrementándose significativamente con respecto a los estudios previos con suspensiones de SWCNTs, tanto en la homogeneidad de la suspensión como en la magnitud de los coeficientes de difusión detectados, siendo el derivado con polietilenglicol el más prometedor.



## CONCLUSIONI

Come conclusione generale a questa Tesi di Dottorato si può indicare che sono stati raggiunti gli obiettivi prefissati. Sono stati ottenuti nuovi CAs con proprietà magnetiche anisotropiche basati su CNTs e complessi di Gd(III) DOTAm che potrebbero essere utilizzati come sonde bivalenti di immagine multimodale grazie alle proprietà magnetiche e di fluorescenza riscontrate.

1. Sono state modellizzate le interazioni  $\pi-\pi$  tra i CNTs e i derivati di pirene ed è stata simulata la diffusione traslazionale dell'acqua in sospensioni di CNTs. I risultati di modellizzazione molecolare mostrano che l'interazione tra i nanotubi di carbonio e i diversi derivati di pirene, è di tipo  $\pi-\pi$  e che la configurazione più favorevole è la parallela sfalsata. I risultati di dinamica molecolare mostrano che l'acqua all'interno del nanotubo si muove più lentamente dell'acqua che si trova all'esterno del nanotubo, inoltre la diffusione dell'acqua interna non segue il modello di Fick ed è chiaramente anisotropica.

2. Sono stati ottenuti CNTs di lunghezza controllata attraverso metodi ossidativi e via ultrasuoni. Queste preparazioni sono state caratterizzate utilizzando un'ampia batteria di tecniche chimico-fisiche.

2.1.SWCNTs: la struttura tubolare dei SWCNTs è stata confermata sia con il TEM che con la spettroscopia Raman. Sono state ottenute mappe di ADC con MRI che indicano una diffusione anisotropica dell'acqua, provocata dall'allineamento dei CNTs rispetto al campo magnetico  $B_0$ . Questo allineamento è stato confermato ottenendo il ciclo di isteresi con SQUID e si è visto come la magnetizzazione risulti maggiore nella direzione parallela al campo magnetico  $B_0$  che nella direzione perpendicolare. I risultati dei test di citotossicità, sia MTT che LDH, dei SWCNTs non hanno mostrato effetti citotossici significativi alle concentrazioni necessarie per l'osservazione dell'anisotropia magnetica.

2.2. MWCNTs: Lo studio della lunghezza dei nanotubi frammentati, realizzato analizzando le immagini TEM, ha fornito un intervallo di lunghezze compreso tra 50 e 300 nm, leggermente inferiore nel caso dei nanotubi ossidati. La frammentazione è stata confermata dall'analisi XPS, TGA e FT-IR.

3. È stato ottenuto un addotto per interazioni  $\pi-\pi$  tra MWCNTs e amminopirene che è stato utilizzato come addotto modello.

3.1. Gli spettri di emissione di fluorescenza dell'addotto al variare del pH paragonati con gli spettri dell'amminopirene, mostrano i picchi caratteristici del'amminopirene come monomero. L' addotto diminuisce la formazione dell'eccimero.

3.2. Gli spettri infrarossi con ATR confermano la funzionalizzazione dei MWCNTs con amminopirene.

3.3. Sono state studiate le cause dell'anisotropia magnetica in preparazioni di nanotubi di carbonio. È stato riscontrato che il comportamento anisotropico dipende dalla lunghezza e dal diametro del CNT, dalla presenza di inomogeneità sulla superficie del CNT, inoltre influiscono le nanoparticelle metalliche (Ni) presente sui nanotubi.

4. Sono stati sintetizzati e caratterizzati cinque diversi leganti derivati di DOTAm con una unità di pirene che variano tra di loro nello spaziatore tra il pirene e la gabbia di coordinazione del Gd(III). Gli spaziatori utilizzati sono: etilendiammina; diammino polietilenglicole; fenile; bispropiletri-ammina e  $N',N'$ -bis(2-amminoetil)etan-1,2-diammina (TREN). Dei derivati di etilendiammina e diamminopolietilenglicole sono stati ottenuti i corrispondenti complessi diamagnetici di La (III) y paramagnetici di Gd (III).

5. Sono stati ottenuti gli addotti per  $\pi-\pi$  in acqua tra MWCNTsCOOH e i complessi di Gd(III) e di La(III) di DOTAmEtilendiamminaPirene e tra MWCNTsUS e i complessi di Gd(III) e di La(III) DOTAmPegPirene.

6. Sono state studiate le proprietà chimico-fisiche dei leganti, complessi e addotti ottenuti.

6.1. Fluorescenza. In tutti i sistemi studiati è stata osservata la fluorescenza caratteristica del pirene come monomero in solventi polari, la formazione dell'addotto sfavorisce la formazione dell'eccimero.

6.2. Relassività. I profili NMRD dei complessi paramagnetici ottenuti mostrano valori di  $r_{1p}$  concordanti con la struttura (DOTAma) e il peso molecolare dei complessi studiati, il derivato con il peg presenta valori leggermente maggiori. Negli addotti, al contrario, i valori di maggiore relassività riguardano il derivato di etilendiammina. Questo risultato è dovuto al fatto che l'addotto ottenuto risulta essere più compatto dell'addotto contenente il peg a causa, nel secondo caso, della rotazione della catena di polietilenglicole. Il vantaggio della relassività è però sminuito dall'inferiore solubilità, che invece è maggiore nel derivato contenente il peg grazie alla presenza degli ossigeni.

6.3. Immagine per Risonanza Magnetica. Le mappe di  $T_1$  e di  $T_2$  a 300 MHz hanno mostrato omogeneità nei campioni e hanno confermato l'effetto su  $T_2$  dei CNTs. Le mappe di ADC hanno confermato la diffusione anisotropica dell'acqua nella direzione del campo magnetico applicato in presenza degli addotti CNTs-complesso di Gd(III), con un effetto significativamente incrementato rispetto agli studi iniziali in sospensioni di SWCNTs ossidati. In particolare si osserva miglioramento sia per quanto riguarda l'omogeneità della sospensione, sia per l'incremento dei valori dei coefficienti di diffusione ottenuti. Il derivato con il polietilenglicole sembra essere il più promettente.

## 6. Parte Experimental

---

“No basta con examinar, hay que contemplar: impregnados de emoción y simpatía las cosas observadas, hagámoslas nuestras, tanto por el corazón como por la inteligencia. Solo así nos entregarán su secreto. Porque el entusiasmo acrecienta y afina nuestra capacidad perceptiva. Al modo del amante que sabe descubrir diariamente en su adorada nuevas perfecciones, quien contempla con delectación un objeto acaba por discernir en él detalles interesantes y propiedades peregrinas escapadas a la atención distraída de los trabajadores rutinarios.”

Santiago Ramón y Cajal



## 6.1. GENERAL

### 6.1.1. Disolventes y reactivos

Los disolventes empleados se han purificado y secado según los procedimientos habituales descritos para cada caso. Los reactivos utilizados se han adquirido en distintas casas comerciales, Sigma-Aldrich (Tres Cantos, ES), Fluka (Tres Cantos, ES), Fischer Scientific (Madrid, ES), Lancaster (Barcelona, ES), Alfa Aesar (Karlsruhe, DE), SDS (Sabadell, ES) y se han empleado sin purificaciones adicionales, excepto cuando se indique lo contrario. Los nanotubos de carbono de pared sencilla se han adquirido en Sigma-Aldrich (Tres Cantos, ES) con una pureza máxima del 40%. Los nanotubos de carbono pared múltiple se han adquirido en SES Research (Houston, TX, US). Para la separación y purificación de productos mediante cromatografía en columna se ha utilizado como soporte gel de sílice 60 (ACC 40-63  $\mu\text{m}$ ) de SDS Carlo Erba (Sabadell, ES). Los productos de reacción se han detectado por cromatografía en capa fina ( $F_{254}$  Merck Gel de Sílice 60, Madrid, ES) por medio de luz ultravioleta ( $\lambda = 254 \text{ nm}$  y  $365 \text{ nm}$ ), o utilizando como reveladores disoluciones de ninhidrina o cámara de  $\text{I}_2$ . La purificación por cromatografía de exclusión molecular se ha llevado a cabo empleando Sephadex LH20 (SUPELCO, Tres Cantos, ES). La purificación mediante diálisis ha tenido lugar en tubos de diálisis Spectra/Por<sup>®</sup> cut off 3500 Da (SpectrumLab, Breda, NL). La filtración de nanotubos de carbono se ha llevado a cabo utilizando el sistema de filtrado de Millipore (Madrid, ES) a vacío sobre membranas Omnipore<sup>®</sup> PTFE (0.45  $\mu\text{m}$ ).

## 6.2. EQUIPOS EMPLEADOS EN LA CARACTERIZACIÓN

La elucidación estructural de los distintos compuestos se ha realizado empleando diferentes técnicas espectroscópicas.

*Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear* de protón ( $^1\text{H}$  RMN): Bruker Avance III (400.13 MHz) (Bruker Biospin, Rheinstetten, DE). Las medidas se han realizado a  $25^\circ\text{C}$  empleando como disolventes  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  y DMSO y utilizando como referencia interna tetrametilsilano

(TMS) o el ácido 2,2,3,3,-tetra deuterio-3-trimetilsililpropiónico (TSP). En algunos casos se han utilizado condiciones de baja temperatura (de 20°C hasta -25°C en intervalos de 5°C) para resolver determinados multipletes. Los datos de  $^1\text{H}$  RMN se expresan de la siguiente forma: desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm, multiplicidad de la señal (s = singlete, sa = señal ancha, d = doblete, t = triplete, c = cuadruplete y m = multiplete), constante de acoplamiento ( $J$ ) en Hercios y número de protones que integra la señal.

*Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear* de carbono ( $^{13}\text{C}$  RMN): Bruker Avance III (100, 62 MHz), (Bruker Biospin, Rheinstetten, DE). Los datos de  $^{13}\text{C}$  RMN se expresan de la siguiente forma: desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm. Los espectros de  $^{13}\text{C}$  se han obtenido mediante la técnica APT (Attached Proton Test) y  $^{13}\text{C}$  desacoplado.

*Espectroscopia infrarroja (FT-IR)*: los espectros de IR se han registrado en un espectrómetro FT-IR Bruker Vector 22, (Bruker Daltonics, Rheinstetten, DE), con analizador ATR (Attenuated Total Reflection), (MKII Golden Gate<sup>TM</sup> Single Reflection ATR System Diamond Crystal y ATR de Germanio Miracle<sup>TM</sup> Selecta). Los datos de FT-IR se encuentran expresados de la siguiente forma: número de ondas de la absorción IR ( $\nu$ ) en  $\text{cm}^{-1}$ .

*Espectrometría de masas (EM)*: Espectrómetro de masas Agilent Technology 6120, (Santa Clara, CA, US). Inyector automático, analizador: simple cuadrupolo, fuente de ionización Electro Spray (ESI), en modo de ionización positivo o negativo.

*Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)*: Espectrómetro de masas Waters VG Autospec (Waters Corporation, Milford, MA, US), inyección directa de la muestra, analizador: sector magnético y fuente de ionización por Bombardeo con Átomos Rápidos (FAB), energía de ionización 70 eV. Patrón Interno: Polietilenglicol (PEGH).

*Masa Exacta ionización electrospray (ESI)*: modo de detección de iones positivos, espectrómetro de masas con analizador híbrido QTOF modelo QSTAR pulsar, de la casa comercial AB Sciex (Framingham, MA, US). Las muestras se introdujeron en el espectrómetro vía infusión directa utilizando

una bomba de jeringa a un flujo de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de la disolución en metanol y se disolvieron en 980  $\mu\text{L}$  de metanol con un 0.1 % de ácido fórmico, que se empleó como fase ionizante.

*Espectrómetro de masas Bruker UltraflexIII Maldi-Tof* (Bruker Daltonics, Rheinstetten, DE) analizador tiempo de vuelo (TOF-TOF) y fuente de ionización desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI).

Los datos de EM se encuentran expresados de la siguiente forma: masa relativa del fragmento por unidad de carga ( $m/z$ ); el ion molecular se especifica como  $M^{•+}$  o  $M^{•-}$ .

*Puntos de fusión* no corregidos (P.f.): microscopio de placa caliente Leica Galen III (Buffalo, NY, US).

Para caracterizar los nanotubos de carbono y los derivados de los nanotubos se han empleado las siguientes técnicas:

*Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)*: microscopio electrónico JEOL JEM2100 (200 kV y 400kV, JEOL, JEM-2000 FX and JEM-4000 EX, Madrid, ES) sobre rejillas de cobre recubiertas con carbón (300 mesh, Ted Pella, Redding, CA, US). La deposición de la muestra sobre las rejillas se ha llevado a cabo empleando suspensiones de nanotubos en  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  y DMF según los casos. HRTEM con EDAX (Análisis de Energía Dispersada con RX) se ha empleado para determinar la composición metálica de las partículas contaminantes.

*Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)*: las imágenes de AFM se han obtenido con un AFM (Nanotec Electrónica, Cervantes FullMode AFM System, Tres Cantos, Madrid, ES) y soporte de silicio monocristalino (Nanosensors Point Probe Plus, Neuchatel, SW) con fuerza constante de 2.8 N/m y frecuencia de resonancia de 75 kHz. Las suspensiones acuosas de nanotubos se han dispersado en baño de ultrasonido durante 15 minutos a una concentración de 1mg/mL. El sobrenadante (2 $\mu\text{L}$ ) se ha depositado sobre un sustrato de mica moscovita y secado al aire para ser analizado por AFM.

*Análisis Termogravimétrico (TGA)*: se lleva a cabo usando en una termobalanza TGA Q500 (TA Instruments, Barcelona, ES) empleando diferentes condiciones que se especificaran en cada caso.



Los datos se expresan en porcentaje de pérdida en peso (%) frente a temperatura (° C).

*Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF)*: TXRF EXTRA-II, Rich & Seifert (Germany), los datos se expresan en % en peso.

*Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)*: espectrómetro Escaprobe Omicron (Taunusstein, DE), con analizador multicanal EA-125, fuente de rayos X radiación  $K\alpha$  del ánodo de Al, 1253.6 eV. Las muestras (0.2 mg) se han compactado en pequeñas pastillas de 15 mm de diámetro y se han desgasificado durante 4 h, hasta alcanzar un vacío dinámico de  $10^{-8}$  Pa antes del análisis. Los espectros se registran a 150 W con una energía de paso de 50 eV en los espectros generales y de 20 eV en los acumulados.

*Superconducting Quantum Interference Device (SQUID)*: (Quantum Design MPMS XL-5, San Diego, CA, US).

*Imagen por Resonancia Magnética (MRI)*: Las imágenes RM se han adquirido en un espectrómetro Bruker Pharmascan (imán horizontal 7.0 Tesla / 16 cm de diámetro) conectado a una consola Hewlett-Packard (Linux; Bruker Medical GmbH, Ettlingen, DE).

*Medidas de tiempos de relajación  $T_1$*  (secuencia de inversión-recuperación): Bruker MiniSpec MQ 60 (1,5 Tesla). Las medidas se han realizado a 37 °C a un pH de 7.2.

*Experimentos de Fluorescencia*: Quanta Master Fluorimeter (PTI, Birmingham, NJ, US).

*Los experimentos de Masa Exacta, TEM, TRXF, Microanálisis, TGA y TGA-MS* se han realizado en el S.I.D.I. de la Universidad Autónoma de Madrid.

*Los estudios de relajatividad* se han llevado a cabo en el “Molecular Imaging Center” del Molecular Biotechnology Center de la Università degli Studi di Turin, Italia.

Las medidas de los tiempos de relajación  $T_1$  y  $T_2$  a frecuencias fijas se han llevado a cabo empleando un espectrómetro Stelar SpinMaster Spectrometer (Stelar s.n.c., Mede (PV), IT) operando a un intervalo desde

20 hasta 80 MHz, empleando las secuencias Inversión Recuperación y Carr Purcell Meiboom Gill (CPMG) respectivamente.

Los perfiles  $^1\text{H}$ -NMRD se han llevado a cabo a 25°C en el relaxómetro a campo cíclico Stelar Spinmaster-FFC field-cycling relaxometer (Stelar S.n.c., Mede (PV), IT) midiendo las velocidades de relajación longitudinales del agua a campos magnéticos comprendidos entre  $2.4 \cdot 10^{-4}$  y 0.47 T (correspondientes a un intervalo desde 0.01 hasta 20 MHz expresado en frecuencia protónica de Larmor). El relaxómetro es capaz de convertir las intensidades de campo magnético en la escala de tiempo de milisegundos trabajando bajo completo control desde el ordenador con una incertidumbre absoluta de  $1/T_1$  of  $\pm 1\%$ .

La temperatura se ha controlado con un calentador de flujo de aire Stelar VTC-91 airflow heater (Stelar s.n.c., Mede (PV), IT), equipado con termopar de cobre-constatan; la temperatura real en la cabeza de la sonda se ha medido con un Fluke 52 k / j termómetro digital (Fluke AG, Zurich, CH), con una incertidumbre de  $\pm 0,3^\circ \text{C}$ .

Los espectros de  $^1\text{H}$ -NMR, registrados para el “método Evans” se han llevado a cabo en un espectrómetro Bruker 600 AVANCE (Bruker, Rheinstetten, DE) a 14.1 T (600.13 MHz para  $^1\text{H}$ ) empleando el programa Bruker Topspin 1.3. El control de la temperatura se ha llevado a cabo empleando la unidad de control de temperatura de Bruker.

*La Imagen por Resonancia Magnética* se ha llevado a cabo en el SIERMAC (Servicio de Imagen y Espectroscopia por Resonancia Magnética de Alto Campo) del Instituto de Investigaciones Biomédicas “A.Sols” del CSIC en Madrid.

*Los experimentos de citotoxicidad y los experimentos de fluorescencia* se han llevado a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “A.Sols” del CSIC en Madrid.

*Los experimentos de SQUID* se han llevado a cabo en el “Istituto di Struttura della Materia” de Monterotondo Scalo, Roma, Italia

*Los experimentos XPS* se han llevado a cabo en el Laboratorio en Química de Superficie de la UNED.

### 6.3. MODELIZACIÓN MOLECULAR

#### 6.3.1. Modelización molecular de interacciones $\pi$ - $\pi$ entre nanotubos de carbono y diferentes moléculas aromáticas: benceno, pireno, aminopireno y nitropireno.

##### 6.3.1.1. Métodos teóricos

Los cálculos se han llevado a cabo utilizando la Teoría del Funcional de la Densidad empleando el funcional wB97xD, que incluye correcciones de largo alcance y permite una descripción mejor de las interacciones de dispersión existentes en este sistema.<sup>221</sup> Los orbitales moleculares se representaron con el conjunto base 6-31G\*\* implementado en el programa Spartan.<sup>222</sup> Todos los sistemas se han tratado con el formalismo spin restringido. Para poder estudiar la interacción de las moléculas aromáticas con los CNTs, las energías de interacción ( $E$ ) se han calculado mediante la siguiente relación:

$$E = E_{\text{CNT\_MOL}} - (E_{\text{CNT}} + E_{\text{MOL}})$$

Donde  $E_{\text{CNT\_MOL}}$  es la energía total del aducto CNT-molécula aromática,  $E_{\text{CNT}}$  es la energía total del nanotubo solo y  $E_{\text{MOL}}$  es la energía de la molécula aromática aislada. Para evitar el Error de Superposición de Bases (BSSE), Spartan utiliza una metodología basada en un único cálculo de la energía utilizando una aproximación denominada “dual basis”, que consiste en utilizar un conjunto, más completo, de bases de alta calidad.

<sup>221</sup> Chai, J. D.; Head-Gordon, M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2008**, *10* (44), 6615-6620.

<sup>222</sup> SPARTAN '10, version 10; Wawefunction: 1992.

## 6.3.2. CÁLCULO DE COEFICIENTE DE DIFUSIÓN MEDIANTE DINÁMICA MOLECULAR

### 6.3.2.1. Método “all-atoms”

Para realizar los cálculos se utilizó el módulo Forcite del software de modelización molecular Materials Studio,<sup>223</sup> de la compañía Accelrys. Los sistemas se equilibran durante 100 ps en el ensemble NVT (n° de partículas, volumen y temperatura constantes) a 300K y para calcular los coeficientes de difusión se analizan las trayectorias del sistema durante 1 ns. Para describir los nanotubos de carbono se utiliza el campo de fuerzas CVFF, mientras que para el agua el campo de fuerzas elegido es el SPC flexible.<sup>224</sup>

Para poder realizar los cálculos se construyen celdas de densidad total 1 g/cc y conteniendo moléculas de agua, uno o dos nanotubos de carbono (6.6) de longitud 50 Å y diámetro 8,1 Å y moléculas de aminopireno en caso de los nanotubos funcionalizados.

Los cálculos “all atoms” realizados para corroborar los resultados de los “coarse grained” emplea un modelo que consiste en un nanotubo (10.0) con una longitud de 50 Å en una celda periódica de dimensiones 40x40x77 de modo que la distancia entre nanotubos de celdas contiguas resulta ser 25 Å.

### 6.3.2.2. Método “Coarse- Grained”

Los cálculos “coarse grained” se hicieron con el módulo Mesocite del software Materials Studio.<sup>223</sup>

El campo de fuerzas utilizado para calcular las interacciones entre partículas es el modelo MARTINI,<sup>165,166</sup> ya que este modelo incluye un conjunto bien desarrollado de parámetros para describir los CNT's. El

<sup>223</sup> Materials Studio 7.0, 2014 (<http://accelrys.com/products/materials-studio/>).

<sup>224</sup> Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. The Missing Term in Effective Pair Potentials. *Journal of Physical Chemistry* **1987**, *91* (24), 6269-6271.

<sup>165</sup> Marrink, S. J.; de Vries, A. H.; Mark, A. E. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (2), 750-760.

<sup>166</sup> Marrink, S. J.; Risselada, H.; Yefimov, S.; Tieleman, D.; de Vries, A. H. The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111* (27), 7812-7824.

cálculo de los coeficientes de difusión se realiza siguiendo el mismo procedimiento que para los cálculos “all-atoms”: se determina el MSD de las moléculas de agua durante tiempos de simulación de hasta 30 ns en el ensemble NVT ( $n^\circ$  de partículas, volumen y temperatura constantes) y a una temperatura de 310 K.

Los modelos utilizados consisten en nanotubos de carbono (10.0) de diámetro 5 Å, de longitud variable (50 -125 Å), con un número de nanotubos de 1 a 4 y distancia entre nanotubos de carbono de distintas celdas entre 15 y 100 Å. La distancia entre nanotubos de carbono de una misma celda se fija en 3,347 Å, que es aproximadamente la distancia de equilibrio entre capas en el grafito.

## 6.4. PURIFICACIÓN Y FRAGMENTACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs) DE PARED SIMPLE (SWCNTs) Y MULTIPLE (MWCNTs)

### 6.4.1. SWCNTs

Se han empleado dos tipos diferentes de SWCNTs según los diferentes tratamientos, ambos adquiridos en Sigma-Aldrich. Unos primeros cuyas características son: diámetro X longitud 0.7-1.2 nm X 2-20  $\mu\text{m}$  producidos por Deposición Química de Vapor y unos segundos Carbon nanotubes 40-60 wt% SWNT  $\varnothing \times L = 2-10 \text{ nm} \times 1-5 \mu\text{m}$  Aldrich producidos por el método de descarga de arco.

#### Procedimiento A: SWNTs-A

Una suspensión de 100 mg de SWNTs comerciales (0.7-1.2 nm X 2-20  $\mu\text{m}$ ) en 50 mL de HCl (0.1 M) se mantiene con agitación, a temperatura ambiente, durante 2 horas. El crudo de reacción se purifica empleando membranas de diálisis Spectra/Por<sup>®</sup> (3500 Dalton), por sucesivos lavados H<sub>2</sub>O MQ hasta que no se observen cambios en el pH.

Se obtienen 95 mg de SWNTs-A por centrifugación (3000 rpm, 10 minutos).

**TGA** 300-500 °C, C amorfo; 13.9% residuo  
(aire sintético)

**TXRF** Co (9.18%), Ni (3.22%),

**FT-IR**  $\nu = 3348, 2972, 2352, 1713, 1599, 1530, 1453, 1054 \text{ cm}^{-1}$   
(ATR)

#### Procedimiento B: SWNTsGd(III)-B<sup>30</sup>

A una suspensión de 80 mg de SWNTs, preparados según el procedimiento A, en 25 mL de H<sub>2</sub>O MQ se le adicionan 112 mg (0.3 mmol) de GdCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O y la suspensión se mantiene en un baño de ultrasonidos. A continuación, la suspensión se centrifuga (3000 rpm; 10 min), se retira el

<sup>30</sup> Sitharaman, B.; Kissell, K. R.; Hartman, K. B.; Tran, L. A.; Baikarov, A.; Rusakova, I.; Sun, Y.; Khant, H. A.; Ludtke, S. J.; Chiu, W.; Laus, S.; Toth, E.; Helm, L.; Merbach, A. E.; Wilson, L. J. Superparamagnetic gadonanotubes are high-performance MRI contrast agents. *Chem. Commun.* **2005**, (31), 3915-3917.

sobrenadante. El residuo se purifica mediante membranas de diálisis Spectra Por<sup>®</sup> (3500 Dalton), por sucesivos lavados con H<sub>2</sub>O MQ hasta que no se observen cambios de pH. Se obtienen 120 mg de SWNTsGd(III)-B por centrifugación.

TGA	300-500 °C, C amorfo; 18.6% residuo
(aire sintético)	
TXRF	Co (10.57%), Ni (3.69%), Gd (0.19%)
FT-IR	$\nu = \text{cm}^{-1}$ 3350, 2974, 2346, 1710, 1534, 1052, 847
(ATR)	

### Procedimiento C: SWNTsCOOH-C<sup>98</sup>

A una suspensión de 200 mg de SWNTs, preparados según el procedimiento A, en 25 mL de HNO<sub>3</sub> (65%) se mantiene con agitación a reflujo durante 24 horas. A continuación, al crudo de reacción se le añaden 100 mL de H<sub>2</sub>O MQ y se centrifuga (3000 rpm; 10 min). Seguidamente se elimina el sobrenadante y se repite el proceso hasta que la suspensión alcance pH = 3. El crudo de reacción se purifica utilizando membranas de diálisis *Spectra/Por*<sup>®</sup> (3500 Dalton) por sucesivos lavados con H<sub>2</sub>O Milli-Q hasta que no se observen cambios de pH. A continuación se evapora el H<sub>2</sub>O a presión reducida, obteniéndose 80.4 mg (40 % en peso) de SWNTsCOOH-C.

TGA	200-300 °C, CO <sub>2</sub> , 300-500 °C, C amorfo; 11.5% residuo
(aire sintético)	
TXRF	Co (1.83%), Ni (0.68%),
FT-IR	$\nu = \text{cm}^{-1}$ 3304(ancho), 2938, 2051, 1715, 1598, 1538, 1373, 1225
(ATR)	

### Procedimiento D: SWNTsCOOHGd(III)-D<sup>30</sup>

A una suspensión de 40 mg de SWNTs, preparados según el procedimiento A, en 25 mL de H<sub>2</sub>O MQ se le adicionan 60 mg (0.15 mmol)

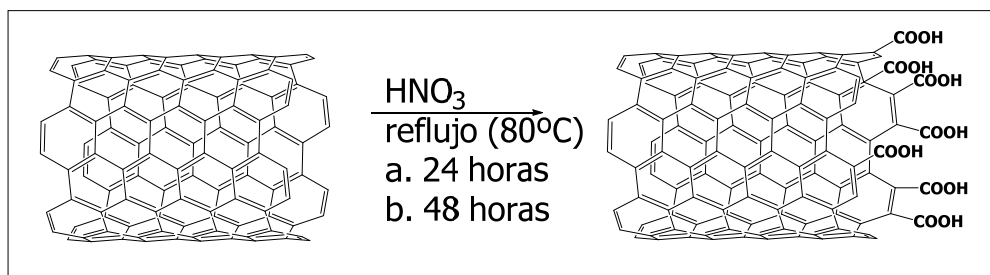
<sup>98</sup> Bourlinos, A. B.; Georgakilas, V.; Tzitzios, V.; Boukos, N.; Herrera, R.; Giannelis, E. R. Functionalized carbon nanotubes: Synthesis of meltable and amphiphilic derivatives. *Small* **2006**, 2(10), 1188-1191.

<sup>30</sup> Sitharaman, B.; Kissell, K. R.; Hartman, K. B.; Tran, L. A.; Baikarov, A.; Rusakova, I.; Sun, Y.; Khant, H. A.; Ludtke, S. J.; Chiu, W.; Laus, S.; Toth, E.; Helm, L.; Merbach, A. E.; Wilson, L. J. Superparamagnetic gadonanotubes are high-performance MRI contrast agents. *Chem. Commun.* **2005**, (31), 3915-3917.

de  $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y la suspensión se mantiene en un baño de ultrasonidos (100 W). A continuación, la suspensión se centrifuga (3000 rpm; 10 min), se retira el sobrenadante. El residuo se purifica mediante membranas de diálisis Spectra/Por<sup>®</sup> (3500 Dalton), por sucesivos lavados con  $\text{H}_2\text{O}$  MQ hasta que no se observan cambios de pH. Se obtienen 60 mg de SWNTsCOOHGd(III)-D por centrifugación.

TGA	200-300 °C, $\text{CO}_2$ , 300-500 °C, C amorfo; 24.8% residuo
(aire sintético)	
TXRF	Co (2.2429%), Ni (0.7926%), Gd (9.7648%)
FT-IR	$\nu = \text{cm}^{-1}$ 3300-2980, 2287, 1565, 1404, 1067
(ATR)	

### SWCNTs: procedimiento E: SWCNTsCOOH<sup>98</sup>



A 200mg de SWCNTs comerciales (Carbon nanotubes 40-60 wt% SWCNTs  $\varnothing \times L = 2-10\text{nm} \times 1-5 \mu\text{m}$ , Aldrich, producidos por el método de descarga de Arco, empleando como catalizadores Ni e Y) se le añaden 25 mL de  $\text{HNO}_3$ . La suspensión obtenida de ácido nítrico y nanotubos de carbono se pone a reflujo (80 °C aprox.). Se ha llevado a cabo el reflujo de nanotubos en períodos de 24 y 48. Al cabo del tiempo se centrifuga la suspensión en ciclos de 1 hora, eliminando el sobrenadante y añadiendo  $\text{H}_2\text{O}$  MQ hasta alcanzar un pH de  $\approx 4$ .

Posteriormente se dializa la suspensión obtenida con membranas Spectra/Por<sup>®</sup> (MWCO 3500 Da), previamente activadas por contacto con  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q durante tres horas, en ciclos de 24 horas cambiando el agua de diálisis cada 8 horas, hasta alcanzar un pH de  $\approx 6$ . Se concentra el agua de dializado a presión reducida. A continuación se secan a 60 °C a vacío en

<sup>98</sup> Bourlinos, A. B.; Georgakilas, V.; Tzitzios, V.; Boukos, N.; Herrera, R.; Giannelis, E. R. Functionalized carbon nanotubes: Synthesis of meltable and amphiphilic derivatives. *Small* **2006**, 2(10), 1188-1191.



presencia de  $P_2O_5$  como agente desecante. Se obtienen 156 mg (78 %) en el caso de los SWCNTsCOOH - 24 horas y 145 mg (72.5 %) para SWCNTsCOOH 48 horas.

#### SWCNTsCOOH 24 horas

TGA	200-300 °C, CO <sub>2</sub> , 428 °C, C amorfo; 629 SWCNTs; 19.5%
(Aire Sintético)	residuo
TXRF	Ni (5.1 %), Y (0.9 %)
FT-IR	$\nu = 3334, 2972, 2873, 1716, 1537 \text{ cm}^{-1}$
(ATR-Ge)	

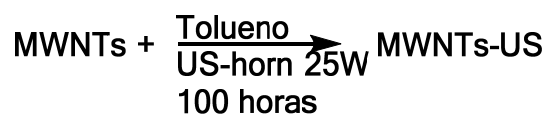
#### SWCNTsCOOH 48 horas

TGA	200-300 °C, CO <sub>2</sub> , 429 °C, C amorfo; 629 SWCNTs; 7.84 %
(aire sintético)	residuo
TXRF	Ni (3.35 %), Y (0.58 %)
FT-IR	$\nu = 3315, 2974, 2873, 1733, 1539 \text{ cm}^{-1}$
(ATR- Ge)	

### 6.4.2. MWCNTs

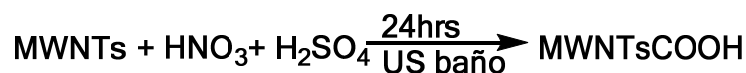
Los nanotubos de carbono multicapa (Short-Purified-MWCNTs) comerciales (SES Research Houston TX USA) empleados han sido sintetizados por Deposición Químicas de Vapor con elevada pureza ya que el contenido en nanotubos es >95% y el contenido en carbono amorfo es < 2%. Tamaño: < 10 nm diámetro exterior X 1-2  $\mu\text{m}$  de longitud, con un contenido en metales determinado por TXRF de: Fe 0.159 %, Co 0.612 %, Ni 0.014 %.

TGA	533 °C, MWCNTs; 4.32 % residuo
(aire sintético)	
TXRF	Fe (0.159%), Co (0.612 %), Ni (0.014 %)
FT-IR	$\nu = 1555, 1150 \text{ cm}^{-1}$
(ATR- Ge)	

**MWCNTs-US<sup>225</sup>**

En un matraz se ponen 200 mg de MWCNTs comerciales en 75 mL de tolueno. Se sonica la suspensión en sonicador de punta con potencia de salida de 25 W manteniendo la temperatura de la reacción por debajo de 30 °C (empleando un baño termostático a 7 °C) durante 100 horas. Al cabo de las 100 horas se filtra la reacción sobre membrana Omnipore<sup>®</sup> (0.45 µm de diámetro) a vacío y se lava con H<sub>2</sub>O y acetona. Se secan obteniéndose 180 mg de nanotubos fragmentados (MWCNTs-US), con un rendimiento en peso del 90%.

TGA	80-199 °C (1.93%), 199-424 °C (1.18%), residuo 92.9%
(Argon)	
TGA	80-256 °C (2.90%), 334-590°C MWCNTs, residuo 4.138 %
(aire sintético)	
TXRF	Fe 0.07%; Co 0.270 %; Ni 0.007 %
FT-IR	$\nu = 1691, 1557, 1413 \text{ cm}^{-1}$
(ATR)	

**MWCNTsCOOH<sup>99</sup>**

Una mezcla de 300 mg de MWCNTs comerciales en 36 mL de ácido sulfúrico al 98% y 12 mL de ácido nítrico al 65% se sonica en un baño de ultrasonidos durante 24 horas, manteniendo la temperatura a 25°C con un

<sup>225</sup> Mackiewicz, N.; Bark, T.; Cao, B.; Delaire, J. A.; Riehl, D.; Ling, W. L.; Foillard, S.; Doris, E. Fullerene-functionalized carbon nanotubes as improved optical limiting devices. *Carbon* **2011**, 49 (12), 3998-4003.

<sup>99</sup> Samori, C.; Sainz, R.; Menard-Moyon, C.; Toma, F. M.; Venturelli, E.; Singh, P.; Ballestri, M.; Prato, M.; Bianco, A. Potentiometric titration as a straightforward method to assess the number of functional groups on shortened carbon nanotubes. *Carbon* **2010**, 48 (9), 2447-2454.

refrigerante.<sup>104, 226</sup> Se añade cuidadosamente H<sub>2</sub>O Milli-Q y se filtran los nanotubos sobre membranas Omnipore<sup>®</sup> (Millipore 0.45 µm), se vuelven a suspender en agua y a filtrar hasta alcanzar pH neutro. Se obtienen 260 mg con un rendimiento en peso del 86.6%.

TGA	93 (1.44%), 350°C (4.581% CO <sub>2</sub> ), 600°C (4.366 % MWCNTs),
(Argon)	residuo 80.17 %.
TGA	350°C (8.366%-CO <sub>2</sub> ), 450-600 °C MWCNTs (88.08%),
(Aire sintético)	residuo 3.332%
TXRF	Fe 0.031 %; Co 0.183 %; Ni 0.007 %
FT-IR	$\nu = 3300, 1910, 1712, 1694, 1560, 1377, 1152, 847 \text{ cm}^{-1}$
(ATR-Ge)	

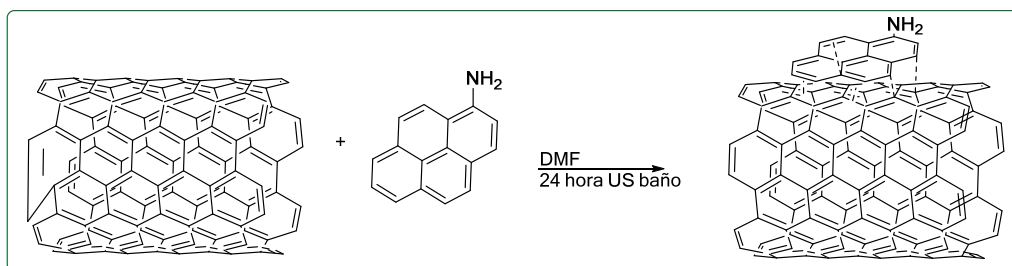
<sup>104</sup> Liu, J.; Rinzler, A. G.; Dai, H. J.; Hafner, J. H.; Bradley, R. K.; Boul, P. J.; Lu, A.; Iverson, T.; Shelimov, K.; Huffman, C. B.; Rodriguez-Macias, F.; Shon, Y. S.; Lee, T. R.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E. Fullerene pipes. *Science* **1998**, *280* (5367), 1253-1256.

<sup>226</sup> Li, S. P.; Wu, W.; Campidelli, S.; Sarnatskaia, V.; Prato, M.; Tridon, A.; Nikolaev, A.; Nikolaev, V.; Bianco, A.; Snezhkova, E. Adsorption of carbon nanotubes on active carbon microparticles. *Carbon* **2008**, *46* (7), 1091-1095.

## 6.5. FORMACIÓN DE ADUCTOS POR INTERACCIONES $\pi$ - $\pi$ ENTRE CNTS AP Y NP

Se han sintetizado aductos por interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los MWCNTs obtenidos por los diferentes métodos de fragmentación y los diferentes ligandos sintetizados anteriormente.

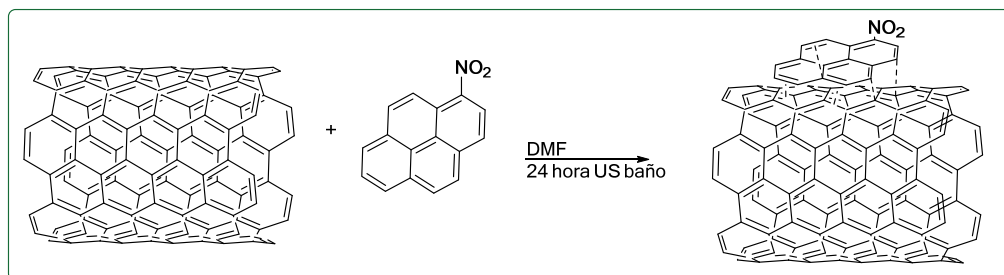
### $\pi$ - $\pi$ MWCNTsCOOH-AminoPireno (16)



Una suspensión de 25 mg de MWCNTsCOOH en 75 mL de DMF se sonica en un baño de ultrasonido durante 24 horas, transcurrido ese tiempo se centrifuga a 3000 rpm durante 30 minutos y se eliminan las partículas insolubles. Se añaden a esta suspensión 160 mg de aminopireno (17). Se mantiene la mezcla de reacción en baño de ultrasonido durante 20 minutos, tras los cuales se mantiene la agitación durante 24 horas.

Se evapora la DMF a presión reducida, el crudo se lava con éter etílico para eliminar el aminopireno en exceso y se filtra sobre membranas Omnipore<sup>®</sup> (Millipore 0.45  $\mu$ m). Se obtienen 17.6 mg de aducto 16.

TGA	93-227°C (5.2 %), 227-525 °C (10.3%), 525-900 °C (13.4%)9,
(Argon)	residuo 77.7%
TGA	220-400 °C (9.6%) AminoPireno, 400-600°C (83.4%)MWCNTs,
(aire sintético)	residuo 5.6 %
TXRF	Fe 0.046 %; Co 0.322 %, Ni 0.005 %
FT-IR	$\nu$ = 3407, 3238, 1907, 1715, 1572, 1413,1151, 1089 $\text{cm}^{-1}$
(ATR-Ge)	

$\pi$ - $\pi$  MWCNTsCOOH-NitroPireno (18)

Una suspensión de 25 mg de MWCNTsCOOH en 75 mL de DMF se sonica en un baño de ultrasonidos durante 24 horas, transcurrido ese tiempo se centrifuga a 3000 rpm durante 30' y se eliminan las partículas insolubles. Se añaden a esta suspensión 160 mg de nitropireno (19). Se mantiene la mezcla de reacción en baño de ultrasonido durante 20 minutos, tras los cuales se mantiene con agitación durante 24 horas.

Se evapora la DMF a presión reducida, el crudo se lava con éter etílico para eliminar el nitropireno en exceso y se filtra sobre membranas Omnipore® (Millipore 0.45  $\mu$ m). Se obtienen 17 mg de aducto (18).

TGA	93-228°C (6 %), 227-400 °C (7.1%), 400-880 °C (8.4%), residuo
(Argon)	79.3%
TGA	93-342 °C (9.18 %) NitroPireno y COOH, 342-598°C(71.7%)
(aire sintético)	MWCNTs, residuo 19.7 % a 590 °C.
TXRF	Fe 0.14 %; Co 0.34 %, Ni 0.012 %
FT-IR	$\nu$ = 3238, 1907, 1712, 1691, 1553, 1413, 1151, 1089 $\text{cm}^{-1}$
(ATR-Ge)	

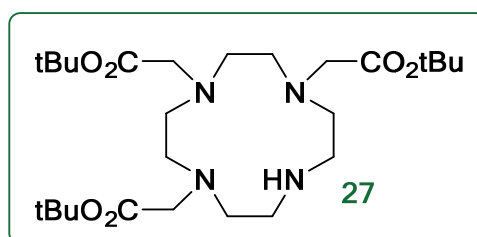
## 6.6. SÍNTESIS DE LOS LIGANDOS Y COMPLEJOS

A continuación se describen tanto la síntesis de los compuestos como los diferentes intentos que no han dado lugar a la obtención del compuesto propuesto. La molécula de interés se mostrará solo en los métodos que han dado lugar a la obtención de la misma.

En algunos casos, debido a la complejidad de la molécula se empleará el nombre trivial, descrito en el capítulo Resultados y Discusión.

### 6.6.1. Derivados de DOTA mono amida

#### 1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7-tetraazaciclododecano (**27**)<sup>191</sup>



A una suspensión de 2 g (11.61 mmol) de 1,4,7,10-tetraazaciclododecano **26** y 3.22 g (38.31 mmol) de NaHCO<sub>3</sub> en 25 mL de CH<sub>3</sub>CN anhidro se le adicionan, lentamente bajo atmósfera de argón, 5.65 mL (38.31 mmol) de bromo acetato de *tert*-butilo. La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente con agitación durante 72 h. A continuación, se filtra el sólido formado y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se purifica por recristalización, en tolueno obteniéndose 2.88 g (48%) del compuesto **27** en forma de un sólido blanco. Para obtener la amina libre de la forma de hidrobromuro se trata el sólido obtenido con DCM anhidro y se burbujea NH<sub>3</sub> gaseoso observando la precipitación de hidrobromuro de amonio, se repite el proceso tres veces, hasta la desaparición del precipitado; se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene el producto **27** deseado con rendimiento cuantitativo.

<sup>191</sup> Dadabhoy, A.; Faulkner, S.; Sammes, P. G. Long wavelength sensitizers for europium(III) luminescence based on acridone derivatives. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **2002**, 348-357.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 1.45 (s, 27H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 2.87 (m, 4H, CH <sub>2</sub> N), 2.92 (m, 8 H, NCH <sub>2</sub> ), 3.09 (m, 4H, NHCH <sub>2</sub> ), 3.28 (s, 2H, CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> -tBu), 3.36 (s, 4H, CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> -tBu) ppm
<sup>13</sup> C-RMN (APT) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 27.9, 28.2, 47.5, 49.2, 51.4, 55.7, 58.2, 81.7, 81.8, 169.6, 170.5 ppm
FT-IR (ATR)	ν = 2900, 2582, 2733, 1717, 1367, 1146 cm <sup>-1</sup>
P.F.	178-180 °C

### Hidrólisis 1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7-tetraazaciclododecano

Una suspensión de 50.4 mg (0.098 mmol) de 1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7-tetraazaciclododecano (27) en 1.5 mL de DCM anhidro, se mantiene con agitación durante 10 minutos, se le añaden 60 µL (0.29 mmol) de triisopropilsilano y se mantiene con agitación otros 5 minutos. Mientras tanto se prepara una mezcla de 400 µL (5.87 mmol) de ácido trifluoroacético en 1 mL de DCM seco y se mantiene a 0°C durante 10 minutos. Se añade esta segunda mezcla a la reacción, se mantiene a 0°C 15 minutos y posteriormente se sube la temperatura de reacción a 25°C manteniendo con agitación durante 1.5 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC y por HPLC-MS (ESI -). Se observa la hidrólisis parcial de los esteres *tert*-butílicos, viendo en HPLC-MS el ion molecular del producto de partida, y principalmente monoácido. Se decide mantener con agitación durante 24 horas. Se sigue el curso de la reacción por HPLC-MS y se observa principalmente hidrólisis completa de los tres esteres *tert*-butílicos presentes aunque quedan también producto de partida, mono y bi hidrolizado. (Datos de HPLC-MS con tiempo de hidrólisis de 24 horas)

HPLC-MS	T: 1.388 min [M+H] <sup>+</sup> C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> 347.2
Columna RP 18	T: 1.929 min [M+H] <sup>+</sup> C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> 403.2; C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> 459.3
ESI-Simple QUAD +	T: 2.122 min [M+H] <sup>+</sup> C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> 514.3; [M+Na] <sup>+</sup> 537.4

ciclododecan-1-il)acetato de *terc*-butilo (28)<sup>192</sup>



de aceite amarillo.

**<sup>1</sup>H-RMN** δ = 1.44 (s, 27H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.77 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>N), 3.43- 2.11 (m, 22 H, CH<sub>2</sub>), 3.47 (s, 2 H, NCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me), 3.69 (s, 3 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN (APT)** δ = 27.9, 51.8, 55.7, 81.9, 172.9, 173 ppm  
(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

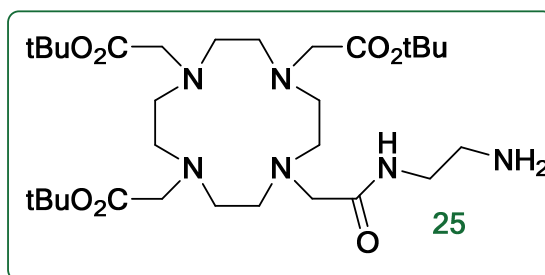
**FT-IR (ATR)** ν = 2976, 2827, 1722, 1368, 1225, 1157, 1106 cm<sup>-1</sup>

**Masa Exacta**  
(MALDI PEGNa  
400+600) C<sub>29</sub>H<sub>55</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M•]+ calculado: 587.40173  
encontrado: 587.40144  
C<sub>29</sub>H<sub>55</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>Na [M•+Na]+ calculado: 609.38464  
encontrado: 609.38339

<sup>192</sup> Andre, J. P.; Galdes, C. F. G. C.; Martins, J. A.; Merbach, A. E.; Prata, M. I. M.; Santos, A. C.; de Lima, J. J. P.; Toth, E. Lanthanide(III) complexes of DOTA-glycoconjugates: A potential new class of lectin-mediated medical imaging agents. *Chemistry-A European Journal* 2004, 10 (22), 5804-5816.



(4-[(2-Aminoetilcarbamoil)metil]-7,10-bis-*tert*-butoxicarbonilmetil-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il)-2- acetato de *tert*-butilo (25)<sup>192</sup>



Una disolución de 100 mg (0.17 mmol) del compuesto **28** en 2 mL de dietilendiamina se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 72 h. A continuación, se evapora el exceso de etilendiamina a presión reducida y el crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna, sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (9/1/0.1). Se obtienen 71 mg (68%) del compuesto **25** en forma de un aceite amarillo.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 1.44 (s, 27H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 3.62-1.95 (m ancho, 30H), 8.81 (m, 1H, NH) ppm.
<sup>13</sup> C-RMN (APT) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 27.8, 27.9, 41.6, 42.3, 49.0, 51.5, 55.6, 55.9, 81.71, 81.74, 170.4, 172.0, 172.1 ppm
FT-IR (ATR)	ν = 3304, 2974, 1727, 1661, 1551, 1159 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (FAB m-NBA)	C <sub>30</sub> H <sub>58</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> Na M <sup>•+</sup> Na calculado: 637.4265 encontrado: 637.4249

**Hidrólisis (4-[(2-aminoetilcarbamoil)metil]-7,10-bis-*tert*-butoxicarbonilmetil-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il)-2- acetato de *tert*-butilo**

Una mezcla de 51.3 mg (0.083 mmol) de (4-[(2-aminoetilcarbamoil)metil]-7,10-bis-*tert*-butoxicarbonilmetil-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il)-2- acetato de *tert*-butilo en 1.5 mL de DCM anhidro, se mantiene con agitación durante 10 minutos, se le añaden 52 µL (0.35 mmol) de triisopropilsilano y se mantiene con agitación otros 5 minutos. Mientras tanto se prepara una mezcla de 400 µL (5.013 mmol) de

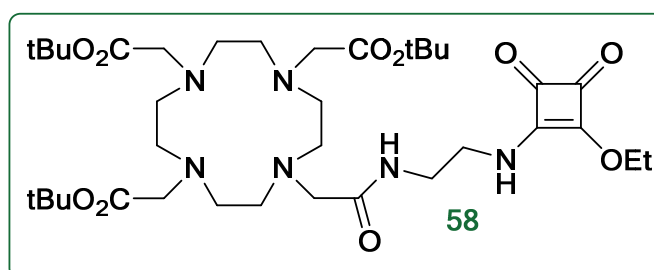
<sup>192</sup> Andre, J. P.; Gerald, C. F. G. C.; Martins, J. A.; Merbach, A. E.; Prata, M. I. M.; Santos, A. C.; de Lima, J. J. P.; Toth, E. Lanthanide(III) complexes of DOTA-glycoconjugates: A potential new class of lectin-mediated medical imaging agents. Chemistry-A European Journal 2004, 10 (22), 5804-5816.

ácido trifluoroacético en 1 mL de DCM seco y se mantiene a 0°C durante 10 minutos. Se añade esta segunda mezcla a la reacción, se mantiene a 0°C 15 minutos y posteriormente se sube la temperatura de reacción a 25°C manteniendo con agitación durante 2 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC y por HPLC-MS (ESI +). Se observan diferentes productos de hidrólisis parcial de los esteres *tert*-butílicos, viendo en HPLC-MS el ion molecular del producto de partida, y principalmente monoácido. Se decide mantener con agitación durante 24 horas. Se sigue el curso de la reacción por HPLC-MS y se observa hidrólisis completa de los tres esteres *tert*-butílicos presentes pero quedan también producto de partida, mono y bi hidrolizado.

(Datos de HPLC-MS con tiempo de hidrólisis de 24 horas)

**HPLC-MS** T: 1.291:1.465 min  $[M+H]^+$   $C_{18}H_{34}N_6O_7$  447.2;  $[M+Na]^+$  469.3;  
 Columna RP 18  $[M+H]^+$   $C_{22}H_{42}N_6O_7$  503.3,  $[M+Na]^+$  524.3;  
 ESI-Simple QUAD +  $[M+H]^+$   $C_{26}H_{50}N_6O_7$  559.3;  $[M+Na]^+$  581.4;  
 T: 1.755- 1832  $[M+H]^+$   $C_{22}H_{42}N_6O_7$  503.3,  
 $[M+Na]^+$   $C_{26}H_{50}N_6O_7$  581.4

**2,2',2''-(10-(2-((2-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de tri-*tert*-butilo (58)**

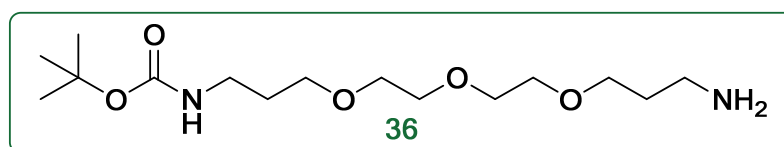


A una disolución de 615 mg (1 mmol) de DOTAetilendiamina (25) en 8 mL de EtOH se le añaden 167  $\mu$ L (1.2 mmol) de Et<sub>3</sub>N anhidra y lentamente una mezcla de 180  $\mu$ L (1.2 mmol) de 3,4-dietoxiciclobut-3-en-1,2-diona en 1 mL de EtOH, se mantiene con agitación durante 24 horas a 25°C. Se sigue el curso de la reacción por TLC y se evapora el disolvente a presión reducida. Se lava el crudo de reacción con H<sub>2</sub>O y DCM, se seca la fase orgánica sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evapora el disolvente a presión

reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna sobre SiO<sub>2</sub> en condiciones isocráticas (97/3/0.3 de DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) obteniéndose 120.1 mg (0.162 mmol) con un rendimiento de 16.2 % del compuesto **58**.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 1.24 (3 H, t, CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ), 1.44 (s, 27H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 3.62-1.95 (m ancho, 30H), 4.72 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ) 8.81 (m, 1H, NH ppm.
<sup>13</sup> C-RMN (APT) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 15.8, 27, 29.6, 40.7, 55.6, 56, 69.4, 82, 171.7, 172.2, 178.2, 183.4, 189.5 ppm
FT-IR (ATR)	ν = 3215, 2975, 2932, 2825, 1800, 1725, 1672, 1603, 1451, 1367, 1225, 1158, 1106 cm <sup>-1</sup>
Masa (ESI-Simple Quad +)	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>10</sub> M <sup>•+</sup> calculado: 738.4527 Encontrado [M+H] <sup>+</sup> : 739.8

### (3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil)carbamato de *tert*-butilo (**36**)



A una disolución de 6 g (27.23 mmol) de diamino peg **35** en 30 mL de DCM anhidro se le añaden, a 0 °C y bajo atmósfera de argón, durante 1h, 2.97 g (13.61 mmol) de dicarbonato de di *tert*-butilo. La mezcla de reacción se mantiene con agitación a 0 °C durante 1 h. A continuación, se eleva la temperatura hasta 25 °C y se mantiene con agitación durante 12 horas. Seguidamente, se sigue el curso de la reacción por TLC y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna, sobre gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH, en gradiente de polaridad de 9/1/0.1 hasta 8/2/0.2, obteniéndose 3.135 g (72%) del compuesto **36** en forma de aceite incoloro.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 1.41 (s, 9H), 1.73 (m, 4H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.39 (bs, 2H, NH <sub>2</sub> ), 2.80 (t, J = 6.5, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ), 3.19 (t, J = 6.7, 2H, NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 3.61-3.51 (m, 12H, CH <sub>2</sub> O), 5.16 (bs, 1H, CONHCH <sub>2</sub> ) ppm
<sup>13</sup> C-RMN-(APT) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 28.2, 29.62, 32.27, 38.44, 39.51, 70.4, 156.08 ppm
FT-IR (ATR)	ν = 2937, 2871, 2359, 2324, 2163, 202, 1980, 1711, 1531, 1366,

	1276, 1366, 1276, 1173, 1120, 891 $\text{cm}^{-1}$
Masa Exacta	$\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$ $\text{M}^{++}$ calculado: 320.2311
(ESI(+)-QTOF)	$[\text{M}+\text{H}]^+$ encontrado: 321.2387

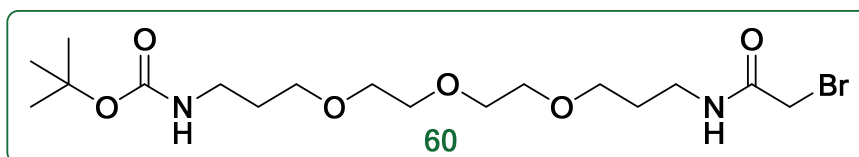
### Intento de obtención de (1-bromo-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azahexadecan-16-il)carbamato de *tert*-butilo

#### Método: Dipea y ACN

A una disolución de 2.76 mmol de (3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil)carbamato de *tert*-butilo (**36**) en 20 mL de ACN seco se le añaden, a 0°C y bajo atmosfera de argón, 1.13 mL (6.62 mmol) de DIPEA seca. La reacción se mantiene con agitación durante 15 min y se adiciona lentamente una mezcla de 288  $\mu\text{L}$  (3.31 mmol) de bromuro de bromoacetilo en 5 mL de ACN seco; se mantiene con agitación a 0°C durante una hora y al cabo de este tiempo se eleva la temperatura a 25°C, se deja reaccionar durante 12 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC. Tras observar la TLC se decide purificar por cromatografía en columna, sobre gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , en gradiente de polaridad de 95/5/0.5 hasta 9/1/0.1, se sigue la cromatografía por HPLC-MS y por RMN pero no se obtiene el producto deseado.

### (1-bromo-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azahexadecan-16-il)carbamato de *tert*-butilo (**60**)

#### Método: $\text{K}_2\text{CO}_3$ y ACN

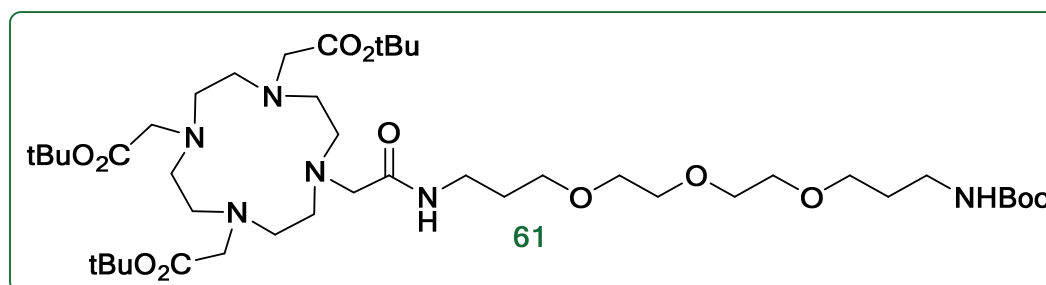


A una disolución de 984.1 mg (3.07 mmol) de (3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil)carbamato de *tert*-butilo (**36**) en 20 mL de ACN anhidro se le añaden, a 0 °C y bajo atmosfera de argón, 466 mg (3.37 mmol) de carbonato potásico. La reacción se mantiene con agitación durante 15 min y se adiciona lentamente una mezcla de 300  $\mu\text{L}$  (3.44 mmol) de bromuro de bromoacetilo en 5 mL de ACN anhidro. Se mantiene con agitación a 0 °C durante una hora y al cabo de este tiempo se eleva la temperatura a 25 °C,

se deja reaccionar durante 12 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC. Se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por extracción con una disolución acuosa de  $\text{KHSO}_4$  a pH 3 y DCM; seguidamente con una disolución acuosa de NaOH; finalmente se seca la fase orgánica con  $\text{MgSO}_4$  y se evapora el disolvente a presión reducida. Tras observar la TLC se decide purificar por cromatografía en columna, sobre gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , en gradiente de polaridad de 95/5/0.5 hasta 9/1/0.1, obteniéndose 778.6 mg (57%) del compuesto deseado **60** en forma de aceite incoloro.

<b><math>^1\text{H}</math>-RMN</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ = 1.43 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{COCONH}$ ), 1.77-1.72 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{Br}$ ), 1.88-1.81(m, 2H $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 3.21 (t, $J$ = 6.9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{Br}$ ), 3.42 (q, 2H, $J$ = 5.7 Hz, $\text{BocNHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.53 (t, $J$ = 6 Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{Br}$ ), 3.69 - 3.56 (m, 10H, $\text{BocNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ , $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.85(s, 2H, $\text{COCH}_2\text{Br}$ ), 4.89(s ancho, 1H, $\text{NHCOCH}_2\text{Br}$ ), 7.12(s ancho, 1H, $\text{NHBoc}$ ) ppm
<b><math>^{13}\text{C}</math>-RMN (APT)</b> (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ = 28.4, 29.3, 29.6, 38.6, 39.0, 69.5, 70.2, 70.5, 79.0, 156.0, 165.5 ppm
<b>FT-IR</b> (ATR-Ge)	$\nu$ = 3310, 2930, 2870, 1712, 1668, 1530, 1454, 1336, 1273, 1250, 1171, 1119 $\text{cm}^{-1}$
<b>Masa Exacta</b> (ESI(+)-QTOF)	$\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{BrNaN}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado: 463.1420 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ encontrado: 463.1417

**2,2',2''-(10-(2,2-dimetil-4,20-dioxo-3,9,12,15-tetraoxa-5,19-diazaenicosan-21-il)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de tri-*terc*-butilo (**61**)**

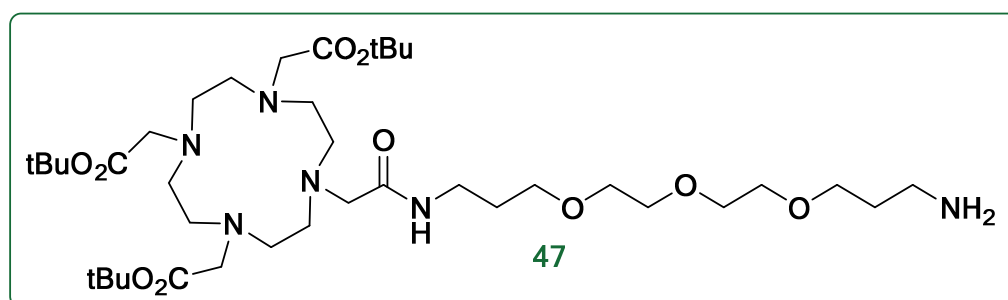


A una disolución de 533.52 mg (1.036 mmol) del éster *terc*-butílico de DO3A (**27**) en ACN seco se le añaden a 0°C, en atmósfera de Argón, 573.05 mg (4.146 mmol) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ; posteriormente se añade una disolución

de 549 mg (1.24 mmol) de **60** en ACN seco. Se mantiene la mezcla de reacción con agitación a 0°C durante 1 hora, se eleva la temperatura hasta 25 °C y se mantiene con agitación durante 48 horas. Se sigue el curso de la reacción por cromatografía en capa fina (TLC) y en HPLC-MS, tras observar la formación del producto, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna sobre SiO<sub>2</sub> en gradiente de polaridad (de 95/5/05.5 hasta 9/1/0.1 DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) obteniéndose 792.6 mg (90%), (0.9 mmol) de producto **61** deseado en forma de aceite marrón.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 1.42 (s, 9H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COCONH), 1.44 (s, 9H, ((CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> NH), 1.45(s, 18H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> NH), 1.9-1.73 (m, 4H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH-Boc, HNCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 3.40-1.95 (señal ancha, 28H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N, NCH <sub>2</sub> CO y CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHCO), 3.69-3.51 (m, 12H, CH <sub>2</sub> O), 4.89 (s ancho, 1H, NHCOCH <sub>2</sub> N), 8.3 (s ancho, 1H, NHBoc) ppm
<sup>13</sup> C-RMN (CPD) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 28.1, 28.4, 29, 29.5, 36.9, 38.5, 48.2, 50, 52.7, 53.6, 54.8, 55.7, 56, 56.7, 68.7, 69.3, 69.6, 81.8, 82, 156, 165.8, 169.7, 169.9, 171.6, 172.3 ppm
FT-IR (ATR-Ge)	ν = 3208, 2976, 2932, 2866, 1729, 1669, 1517, 1455, 1367, 1308, 1227, 1163, 1121, 1108, 1007, 976, 852, 756 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (ESI(+)-QTOF)	C <sub>43</sub> H <sub>82</sub> N <sub>6</sub> O <sub>12</sub> [M+H] <sup>+</sup> calculado: 875.5991 [M+H] <sup>+</sup> encontrado: 875.6107 [M+Na] <sup>+</sup> : 897.5915

**2,2',2''-(10-(16-amino-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azaexadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de tri-*terc*-butilo (47)**



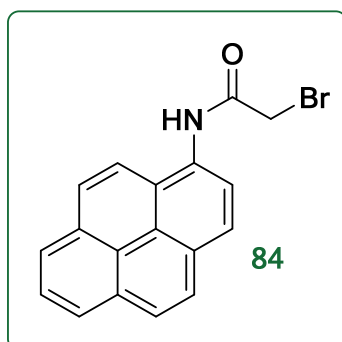
Una mezcla de 373.5 mg (0.42 mmol) de 2,2',2''-(10-(2,2-dimetil-4,20-dioxo-3,9,12,15-tetraoxa-5,19-diazaenicosan-21-il)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de tri-*terc*-butilo (**61**) en 10 mL de DCM anhidro, se mantiene con agitación durante 10 minutos, se le añaden 88 μL (0.35 mmol) de triisopropilsilano y se mantiene con agitación otros 5

minutos. Se prepara una mezcla de 680  $\mu\text{L}$  (8.53 mmol) de ácido trifluoroacético en 1 mL de DCM seco y se mantiene a 0°C durante 10 minutos. Se añade esta segunda mezcla a la reacción, se mantiene a 0°C 15 minutos y posteriormente se sube la temperatura de reacción a 25°C manteniendo la agitación durante 2 horas. Se sigue el curso de la reacción por HPLC-MS (ESI +). Tras observar el ion molecular del producto hidrolizado y la desaparición del producto protegido con Boc se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el crudo de reacción por cromatografía sobre Amberlita Básica fuerte IRA400 hasta llegar a pH = 7. Se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose 242.5 mg (0.31 mmol) (75%) de **47**.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	$\delta$ = 1.48 (s, 9H, ((CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> NH)), 1.49(s, 18H, ((CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> NH), 1.9-1.73 (m, 6H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> HNCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> , CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ), 3.28-2.00 (multiplete ancho, 26H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N, NCH <sub>2</sub> CO y CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHCO), 3.65-3.52 (m, 12H, CH <sub>2</sub> O)
<sup>13</sup> C-RMN (CPD) (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	$\delta$ = 28.4, 30.4, 30.5, 33.3, 37.6, 40.2, 57.3, 60.1, 69.9, 71.2, 71.5, 82.4, 173.1, 174.4, 195.8
FT-IR (ATR-Ge)	$\nu$ = 2934, 2862, 2360, 17630, 1665, 1597, 1455, 1425, 1381, 1368, 1309, 1226, 1161, 1106, 1007, 976, 898, 850, 756 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (ESI(+)-QTOF)	C <sub>38</sub> H <sub>74</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub> [M+H] <sup>+</sup> calculado: 775.5466 [M+H] <sup>+</sup> encontrado: 775.5565 [M+Na] <sup>+</sup> : 797.5351

### 6.6.2. Derivados de aminopireno

#### 2-bromo-N-(piren-1-il)acetamida (**84**)



A una mezcla de 300 mg (1.38 mmol) de aminopireno (**17**) y 419 mg (3.03 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 10 mL de ACN seco se le añade lentamente a

0°C, bajo atmósfera de Ar, una disolución de 0.132 mL (1.52 mmol) de bromuro de bromoacetilo en 3 mL de ACN seco. Se mantiene con agitación a 0°C durante 1 hora, posteriormente se sube la temperatura a 25 °C y se mantiene agitando durante 12 horas. Al cabo de este tiempo se observa la formación de un precipitado, que se elimina por filtración. Se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el crudo de reacción por extracción con DCM (20 mL) y una disolución acuosa de KHSO<sub>4</sub> a pH 3 (2 x 15 mL), se lava entonces la fase orgánica con una disolución acuosa de 0.1 M NaOH (2 x 15 mL) y finalmente con una disolución saturada de NaCl (2 x 15 mL), se seca la fase orgánica sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose 114 mg (0.33 mmol) (24 %) de **84**.

<sup>1</sup>H-RMN  $\delta$  = 3.80 (s, 2H, NHCOCH<sub>2</sub>Br), 8.29 - 7.810 (m, 9H, Ar)  
(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**Intento de obtención de: 2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-((2-oxo-2-(piren-1-ilamino)etil)amino)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de tri-*terc*-butilo**

A una mezcla de 104 mg (0.17 mmol) de DOTamaEtilendiamina **25**, 54 mg (0.38 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 10 mL de ACN seco se le añade lentamente a 0°C, bajo atmósfera de argón una disolución de 50 mg (0.15 mmol) de 2-bromo-*N*-(piren-1-il)acetamida **75** en 5 mL de ACN seco. Se mantiene con agitación a 0°C durante 1 hora, posteriormente se sube la temperatura a 25 °C y se mantiene agitando durante 12 horas. Se sigue el curso de la reacción tanto por TLC, como por HPLC-MS (ESI +) pero no se observa la formación del producto de alquilación, tan solo los productos de partida.



**Intento de obtención de 2,2',2''-(10-(2,19-dioxo-19-(piren-1-ilamino)-7,10,13-trioxa-3,17-diazanonadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de tri-*terc*-butilo**

A una mezcla de 235 mg (0.29 mmol) de hidrocloreuro de tris-(1,4,7,10-*terc*-butoxicarbonilmetil)-10-carbonilmetil-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-*N*-(4',7',10'trioxadodecan) de amonio y 0.16 mL de DIPEA en 5 mL de DCM seco se le añade lentamente a 0°C, bajo atmósfera de argón, una disolución de 103 mg (0.32 mmol) de 2-bromo-*N*-(piren-1-il)acetamida **84** en 4 mL de DCM seco. Después de la adición se eleva la temperatura a 25 °C y se mantiene con agitación durante 12 horas. Se sigue por TLC y por HPLC-MS. Después de evaporar el disolvente a presión reducida se decide purificar el crudo de reacción por cromatografía en columna sobre SiO<sub>2</sub> empleando como eluyente una mezcla de DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH en gradiente de polaridad (de 98/2/0.2 hasta 1/1/0.1). Se analizan todas las fracciones tanto por HPLC-MS como por RMN y en ninguna se observa la formación del producto de alquilación.

**Intento de obtención de: 2,2',2''-(10-(2-((2-((3,4-dioxo-2-(piren-1-ilamino)ciclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato tri-*terc*-butilo**

A una disolución de 45 mg (0.06 mmol) de **58** en 5 mL de EtOH se le añaden 15 mg (0.07 mmol) de aminopireno. Se mantiene con agitación durante 12 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC y no se observa la formación de ningún producto. Se añaden al crudo de reacción 23 µL (0.134 mmol) de DIPEA y se mantiene con agitación durante 24 horas, tras observar la TLC se observa que no se ha formado ningún producto. Se calienta la mezcla de reacción a 60°C durante 12 horas, pero tampoco se obtiene el producto de alquilación.

### 6.6.3. Derivados de ácido pirenilbutírico

#### 2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de tri-*terc*-butilo. (31)

##### Método: cloruro de oxalilo

A una disolución de 145 mg (0.5 mmol) de ácido pirenilbutírico (29) en 5 mL DCM seco, previamente ultrasonificada en baño de ultrasonido durante 10' para favorecer la solubilidad, se le añade en atmosfera de argón y a 0°C una disolución de 52 µL de cloruro de oxalilo en 0.5 mL de DMF. A continuación, se eleva la temperatura hasta 25 °C y se mantiene la mezcla con agitación durante 45'. Seguidamente, se sigue el curso de la reacción por TLC y se evapora el disolvente a presión reducida. Después de la formación del cloruro de ácido *in situ* se sigue con el paso de condensación. A una disolución de 280 mg (0.45 mmol) de DOTAetilendiamina 25 y 0.08 mL de piridina en 3 mL de DCM anhidro se le añade a 0°C en Ar, la mezcla de cloruro de ácido pirenilbutírico, obtenido previamente en 5 mL de DCM anhidro. Se eleva la temperatura hasta 25 °C y se mantiene la mezcla de reacción con agitación durante 48 horas. Al cabo de este tiempo se sigue el curso de la reacción por TLC. Se lava el crudo con agua y finalmente con una disolución saturada de NaCl, se seca la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente de polaridad (de 95/5/0.5 hasta 1/1.01 DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH), obteniéndose 58.3 mg (0.06 mmol) (13%) de producto de condensación 31.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 1.39 (s, 9H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ), 1.42 (s, 18H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ), 3.58 - 1.58 (m, 33H), 8.20 - 7.88 (m, 7H), 8.39 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 2H), 8.56 (s, 1H, NH), 8.95 (s, 1H, NH)
<sup>13</sup> C-RMN (CPD) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 29.2, 30.3, 31.8, 33.9, 36.8, 38.1, 41.8, 69.9, 71.2, 71.4, 124.5, 126.1, 127.1, 127.8, 128.6, 130.1, 131.8, 132.9, 176.1
FT-IR (ATR-Ge)	ν = 3235, 2975, 2931, 2826, 1728, 1670, 1540, 1454, 1368, 1310, 1310, 1228, 1163, 1107, 976, 850 cm <sup>-1</sup>
Masa (ESI(+)-QTOF)	C <sub>50</sub> H <sub>72</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> calculado: 884.5412 encontrado: [M + H] <sup>+</sup> 885.5

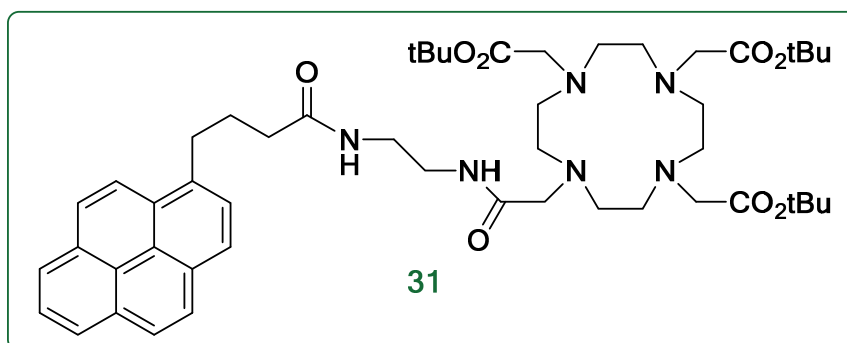
**Intento de obtención de: Ácido 2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacético (32)**

**Método: ácido trifluoroacético**

A una disolución de 50 mg (0.05 mmol) de **31** en 3 mL de DCM seco se le añaden 0.43 mL (5.59 mmol) de ácido trifluoroacético en 1 mL de DCM. Se mantiene con agitación durante dos horas.

Se sigue el curso de la reacción por HPLC-MS observando solo la hidrólisis parcial de los esteres *tert*-butilicos.

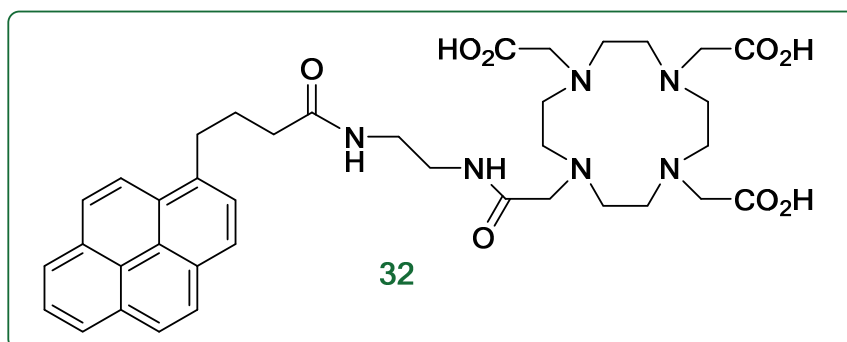
**2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de tri-*tert*-butilo (31)**



A una disolución en atmosfera de argón de ácido pirenilbutirrico-*N*-hidroxisuccinimida (**15**) (960 mg, 1.56 mmol) en 10 mL de DMF se le añaden 0.8 mL (4.7 mmol) de DIPEA; se deja reaccionar durante 10 minutos y finalmente se adiciona una disolución de **25** (601 mg, 1.56 mmol) en 5 mL de DMF. La mezcla de reacción se mantiene con agitación durante 12 h. Seguidamente, se sigue el curso de la reacción por TLC y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el crudo de reacción por extracción con una disolución acuosa de KHSO<sub>4</sub> a pH 3 y DCM; se seca la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión reducida. Tras observar la TLC se decide purificar el crudo por cromatografía en columna en condiciones isocráticas (95/5/0.5 de DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) obteniéndose 476 mg (0.54 mmol) (34%) de **31** en forma de aceite marrón.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD -25 °C)	δ = 1.41 (s, 18H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.43 (s, 9H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ) 3.29-1.62 (m ancho, 34H), 7.89 (d, J= 8Hz, 1H, CH <sub>2</sub> CCHCH Ar), 8(d, J= 8 Hz, 1H CCCHCHCCHCHCHCHC Ar), 8.05 (fs, 3H, CH Ar), 8.14 (d, J= 8Hz, 2H, Ar) 8.17 (ft, 2H, CCCHCHCCHCHCHCHC), 8.33 (d, 1H, J = 8 Hz, CH Ar) ppm
<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD - 20 °C)	δ = 1.36 (s, 18H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.38 (s, 9H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.55-1.49(m ancho, 6H) 1.74-1.64 (m, 2H), 2.57-2.09 (m ancho, 18H), 3.28-2.99 (m ancho 6H), 3.5 (m, 2H), 7.83 (d, J= 8Hz, 1H, CH <sub>2</sub> CCHCH Ar), 7.96(fs, 3H, CH Ar), 8.08(d, J= 8Hz, 1H CCCHCHCCHCHCHCHC Ar), 8.14 (ft, 2H, CCCHCHCCHCHCHCHC), 8.30(d, 1H, J=8Hz, ) ppm
<sup>13</sup> C-RMN (APT) (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	δ = 29.2, 30.3, 31.8, 33.9, 36.8, 38.1, 41.8, 69.9, 71.2, 71.4, 124.5, 126.1 127.1, 127.8, 128.6, 130.1, 131.8, 132.9, 176.1
FT-IR (ATR-Ge)	ν = 3235, 2975, 2931, 2826, 1728, 1670, 1540, 1454, 1368, 1310, 1310, 1228, 1163, 1107, 976, 850 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (ESI+, TOF)	C <sub>50</sub> H <sub>72</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> calculado: 884.5412 encontrado: [M + H] <sup>+</sup> 885.5505 [M + Na] <sup>+</sup> 907.5290 [M + 2H] <sup>2+</sup> /2 443.2788

**Ácido 2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacético (32)**<sup>194</sup>

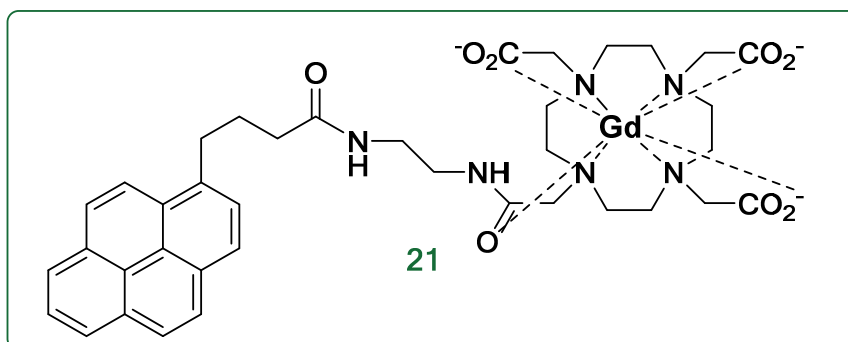


Una mezcla de 130 mg (0.147 mmol) de 2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de tri-*terc*-butilo (31) en 800 mg (8.5 mmol) de fenol se calienta a 60°C; hasta completa disolución de fenol. Posteriormente se añaden 0.31 mL de HCl 35% (10.18 mmol) y se mantiene con agitación a 60°C durante 4 horas. Se sigue el curso de la reacción por cromatografía en capa fina. Se purifica el crudo de reacción por extracción con H<sub>2</sub>O/Et<sub>2</sub>O para eliminar el fenol, posteriormente se extrae la fase acuosa con DCM, finalmente se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose 61 mg de producto hidrolizado 32 con rendimiento del 58%. Se confirma la hidrólisis del producto por HPLC-MS en modo negativo.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	δ = 2.15 (m, 2H), 2.40 (ft, J = 8 Hz, 2H), 3.9-3.35 (m ancho 28 H), 7.91 (d, J = 8Hz, 1H, CH <sub>2</sub> CCHCH Ar), 8(d, J = 8Hz, 1H CCCHCHCCHCHCHC Ar), 8.02-7.93 (fs, 3H, CH Ar), 8.16 (d, J = 8Hz, 2H, Ar) 8.19 (ft, 2H, CH Ar), 8.39 (d, 1H, J = 8Hz, ) ppm
<sup>13</sup> C-RMN (APT) (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	δ = 29.1, 33.9, 36.9, 39.7, 40.5, 124.5, 125.9, 126, 127.1, 127.8, 128.4, 128.6, 129.9, 131.4, 132.3, 132.8, 137.5, 176.5
FT-IR (ATR-Ge)	ν = 3235, 2975, 2931, 2826, 1728, 1670, 1540, 1454, 1368, 1310, 1310, 1228, 1163, 1107, 976, 850 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (ESI+, TOF)	C <sub>38</sub> H <sub>48</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> calculado: 717.3606 encontrado: [M + H] <sup>+</sup> 717.3581

<sup>194</sup> Torii, S.; Tanaka, H.; Taniguchi, M.; Kameyama, Y.; Sasaoka, M.; Shiroy, T.; Kikuchi, R.; Kawahara, I.; Shimabayashi, A.; Nagao, S. Deprotection of Carboxylic Esters of Beta-Lactam Homologs - Cleavage of Para-Methoxybenzyl, Diphenylmethyl, and Tert-Butyl Esters Effected by A Phenolic Matrix. *Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56 (11), 3633-3637.

**2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de Gd (III) (21)<sup>195</sup>**



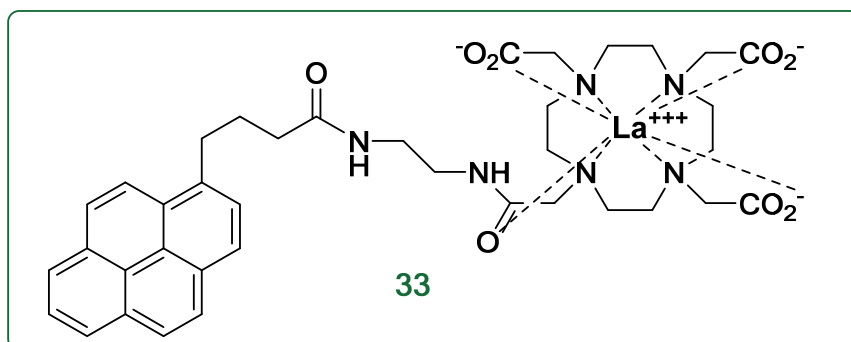
A una disolución acuosa de 290 mg (0.0404 mmol) de 32 se le añaden 226 mg (0.606 mmol) de tricloruro de gadolinio hexahidrato. Tras subir el pH a 7.02 se mantiene con agitación a 60°C durante 24 horas. Se sigue el curso de la reacción por HPLC-MS, confirmándose la formación del complejo. Se elimina el Gd en exceso subiendo el pH a 8 para favorecer la formación y precipitación de hidróxido de gadolinio que se elimina centrifugando durante 25 minutos a 3000 revoluciones por minuto. Se realiza el test colorimétrico de naranja de xilenol en tampón de urotropina para verificar la ausencia de gadolinio libre. Se purifica el crudo a través de una columna de chelex en H<sub>2</sub>O Milli-Q para eliminar el Gd(III). Se evapora el agua de la fracción de interés obteniendo 254 mg de complejo 21 con un rendimiento del 72%.

**FT-IR (ATR)**  $\nu = 3405, 2924, 1602, 1435, 1396, 1321, 1279, 1244, 1084, 940, 844 \text{ cm}^{-1}$

**Masa Exacta**  $\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{GdN}_6\text{O}_8$ : [M] 870.06  
(ESI -, Simple Cuad) Encontrado, [M+Na]: 894.2442

<sup>195</sup> Rudovsky, J.; Botta, M.; Hermann, P.; Koridze, A.; Aime, S. Relaxometric and solution NMR structural studies on ditopic lanthanide(III) complexes of a phosphinate analogue of DOTA with a fast rate of water exchange. *Dalton Transactions* **2006**, (19), 2323-2333.

**2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de La (III) (33)<sup>196</sup>**



A una disolución acuosa de 35.5 mg (0.05 mmol) de **32** en 40 mL de H<sub>2</sub>O MQ (pH inicial de 2.51) se ajusta el pH a 6.6 con 350 µL de NaOH (0.1 y 1 N). Se añaden otros 4.65 mL de H<sub>2</sub>O MilliQ y 1 mL de una disolución acuosa de 7 mg, (0.019 mmol, 0.25 eq-mol) de tricloruro de lantano heptahidratado en 4 mL de H<sub>2</sub>O MilliQ (pH 4.7). Se añaden 230 µL de NaOH 0.1 M, 30 µL de NaOH 1M, 1710 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ (pH = 6.23) y se mantiene con agitación a 60 °C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se deja enfriar a 25 °C y se sigue el curso de la complejación a través del test colorimétrico de naranja de xilenol en tampón acetato (50 mM) a pH = 5.8: no se observa viraje se añaden los 21 mg (0.75 eq mol) que quedaban de cloruro de lantano heptahidratado. Se mantiene la reacción con agitación a 60 °C durante 12 horas. Se vuelve a comprobar ausencia de La libre por medio del test colorimétrico de naranja de xilenol en tampón acetato, en este caso vira. Se purifica por Chelex 100 (método del matraz), se evapora el disolvente a presión reducida. Se comprueba la presencia del complejo **33** por HPLC-MS (ESI +).

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	δ = 2.15 (m, 2H), 2.40 (ft, J = 8 Hz, 2H), 3.9-3.35 (m ancho 28 H), 7.93 (d, J= 8Hz, 1H, CH <sub>2</sub> CCHCH Ar), 8.01(d, J= 8Hz, 1H CCCHCHCCHCHCHC Ar), 8.02-7.93 (fs, 3H, CH Ar), 8.16 (d, J=8Hz, 2H, Ar) 8.19 (ft,2H, CH Ar), 8.39 (d, 1H, J=8Hz) ppm
<sup>13</sup> C-RMN (APT) (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	δ = 29.1, 33.9, 36.9, 39.7, 40.5, 124.5, 125.9, 126, 127.1, 127.8, 128.4, 128.6, 129.9, 131.4, 132.3, 132.8, 137.5, 176.5

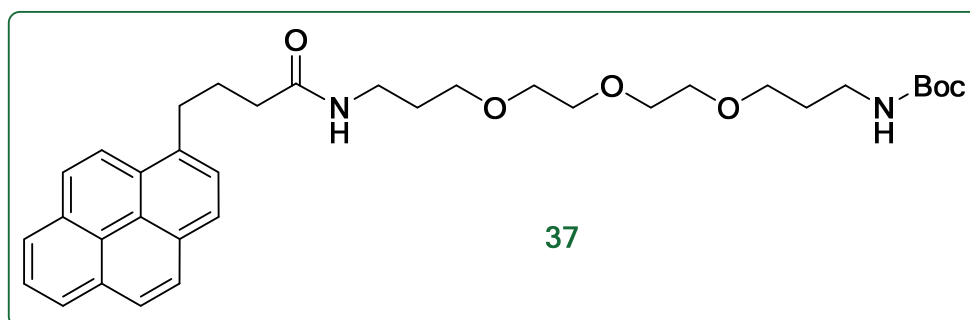
<sup>196</sup> Barge, A.; Cravotto, G.; Gianolio, E.; Fedeli, F. How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2006**, 1 (5), 184-188.

FT-IR (ATR)	$\nu = 3405, 2924, 1602, 1435, 1396, 1321, 1279, 1244, 1084, 940, 844 \text{ cm}^{-1}$
Masa Exacta	$\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{LaN}_6\text{O}_8$ : calculado [M] 852.2362
ESI +	Encontrado, [M+Na]: 875.2199 [M+2Na] <sup>+</sup> /2: 553.328

**Intento de obtención de 2,2',2''-(10-(2,18-dioxo-21-(piren-1-il)-7,10,13-trioxa-3,17-diazaenicosil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacetato de tri-*terc*-butilo (40)**

A una disolución de 134 mg (0.58 mmol) de ácido pirenilbutírico (29) en 5 mL DCM seco, previamente ultrasonificada en baño de ultrasonido durante 10 min para favorecer la solubilidad, se le añade en atmosfera de Ar y a 0 °C una disolución de 55  $\mu\text{L}$  de cloruro de oxalilo en 0.5 mL de DMF. A continuación, se eleva la temperatura hasta 25 °C y se mantiene la mezcla de reacción con agitación durante 45'. Seguidamente, se sigue el curso de la reacción por TLC y se evapora el disolvente a presión reducida. Después de la formación del cloruro de ácido *in situ* se sigue con el paso de condensación. A una disolución de 500 mg (0.65 mmol) de 2,2',2''-(10-(16-amino-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azaexadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de tri-*terc*-butilo y 0.114 mL (1.42 mmol) de piridina en 15 mL de DCM anhidro se le añade, a 0°C en Ar, la mezcla de cloruro de ácido pirenilbutírico, obtenido previamente en 5 mL de DCM anhidro. Se eleva la temperatura hasta 25 °C y se mantiene la mezcla de reacción con agitación durante 48 horas. Al cabo de este tiempo se sigue el curso de la reacción por TLC. Se purifica el producto por cromatografía en columna sobre  $\text{SiO}_2$  en gradiente de polaridad (de 95/5/05.5 hasta 1 MeOH) obteniéndose 262 mg (42%) de 40.



**(15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)carbamato de *tert*-butilo (37)****Método: cloruro de oxalilo<sup>193</sup>**

A una disolución de 170 mg (0.74 mmol) de ácido pirenilbutírico (29) en 5 mL DCM seco, previamente ultrasonificada en baño de ultrasonido durante 10' para favorecer la solubilidad, se le añade en atmosfera de Ar y a 0°C, una disolución de 55 µL de cloruro de oxalilo en 0.5 mL de DMF. A continuación, se eleva la temperatura hasta 25 °C y se mantiene la mezcla de reacción con agitación durante 45'. Seguidamente, se sigue el curso de la reacción por TLC y se evapora el disolvente a presión reducida. Después de la formación del cloruro de ácido *in situ* se sigue con el paso de condensación. A una disolución de 500mg (0.814 mmol) (3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil)carbamato de *tert*-butilo 36 y 0.131 mL (1.628 mmol) de piridina en 15 mL de DCM anhidro se le añade a 0°C en Ar, la mezcla de cloruro de ácido pirenilbutírico, obtenido previamente en 5 mL de DCM anhidro. Se eleva la temperatura hasta 25 °C y se mantiene la mezcla de reacción con agitación durante 48 horas. Al cabo de este tiempo se sigue el curso de la reacción por TLC. Se purifica el producto por cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente de polaridad (de 95/5/0.5 hasta 1/1/0.1 DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) obteniéndose 324 mg (42%) de 37 en forma de aceite marrón.

<sup>193</sup> Uruma, Y.; Sugiura, M.; Harumoto, T.; Usuki, Y.; Iio, H. Synthesis of fluorescent molecular probes specific for the receptor of blepharismone, a mating-inducing pheromone of the ciliate *Blepharisma japonicum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*(4), 1622-1627.

<sup>1</sup>H-RMN

(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ = 1.41 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCONH), 1.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 1.76 (m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.22-2.20 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 2.28-2.26 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 3.16-3.13 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 3.41-3.36 (m, 6H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 3.55-3.49 (m, 10H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.89 (s ancho, 1H, CONH), 6.25 (s ancho, 1H, NHCOOtBu), 7.87 (d, J = 8Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CCHCH Ar), 8 (ft, J = 8Hz, CCCHCHCCHCHCHC Ar), 8.02(fs, 2H, CH Ar), 8.10(d, J = 12Hz, 2H, Ar), 8.17-8.14(dd, 2H, J<sup>2</sup> = 12Hz, J<sup>3</sup> = 4Hz CCCHCHCCHCHCHC) 8.31(d, J = 9.6Hz, 1H)

<sup>13</sup>C-RMN (APT)

(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ = 27.6, 28.4, 28.7, 29.6, 32.8, 35.8, 38.3, 38.6, 69.3, 69.9, 70.1, 70.3, 70.3, 79.1, 123.4, 124.7, 124.8, 125.0, 125.8, 126.7, 127.3, 127.4, 128.7, 129.9, 130.9, 131.8, 135.9, 156.0, 173.0

FT-IR (ATR)

Masa

(ESI(+)-Simple Quad)

ν = 2940, 2876, 1781, 1647, 1509, 1203, 1159, 846, 721 cm<sup>-1</sup>

C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+•]<sup>+</sup> calculado: 590.3396

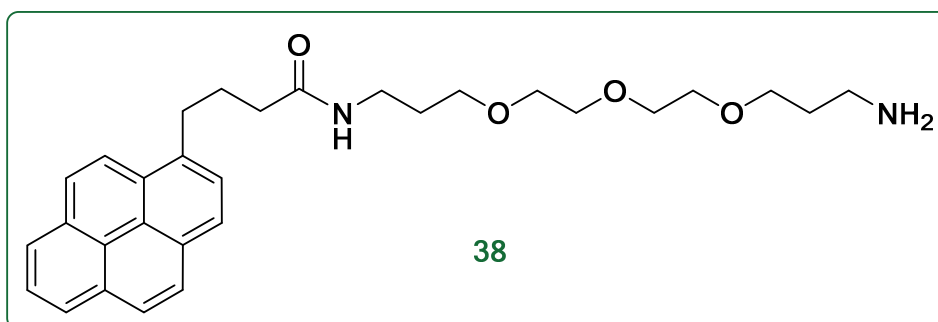
encontrado: 591.4

**Método: ácido pirenilbutírico *N*-hidroxisuccinimida.**

A una disolución de ácido pirenilbutírico-*N*-hidroxi succinimida (**15**) (879 mg, 2.27 mmol) en 10 mL de DMF seca se le añaden en atmosfera de argón 1.17 mL (6.84 mmol) de DIPEA; se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos y finalmente se adiciona una disolución de (804 mg, 2.5 mmol) de (3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil) carbamato de *tert*-butilo **36** en 5 mL de DMF seca. La mezcla de reacción se mantiene con agitación durante 12 h. Seguidamente, se sigue el curso de la reacción por TLC y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el crudo de reacción por extracción con una disolución acuosa de KHSO<sub>4</sub> a pH 3 y DCM; se seca la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtienen 1.34 g de (15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)carbamato de *tert*-butilo **37** en forma de aceite marrón con rendimiento cuantitativo con características espectroscópicas idénticas a las obtenidas por el método de cloruro de oxalilo.

**Masa Exacta**  
(ESI + TOF-MS)

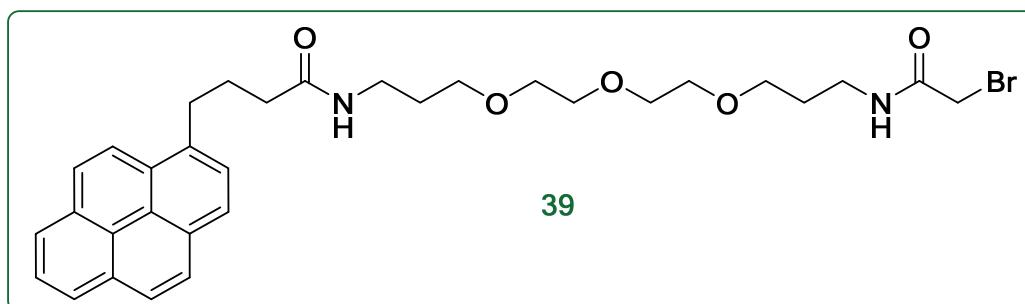
C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+•]<sup>+</sup>calculado: 590.3396  
encontrado: [M+H]<sup>+</sup> 591.3441 y [M+Na]<sup>+</sup> 613.3254

***N*-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida (**38**)**

Una disolución de 205 mg (0.35 mmol) de (15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)carbamato de *tert*-butilo (**37**) en 10 mL de DCM seco, se mantiene a 0 °C con agitación durante 10 minutos, se le añaden 73 µL (0.35 mmol) de triisopropilsilano y se mantiene con agitación otros 5 minutos. Mientras tanto se prepara una mezcla de 573 µL (7 mmol) de ácido trifluoroacético en 1 mL de DCM seco y se mantiene a 0°C durante 10

minutos. Se añade esta segunda mezcla a la reacción, se mantiene a 0°C 15 minutos, posteriormente se sube la temperatura de reacción a 25°C manteniendo con agitación durante 2 horas. Se sigue el curso de la reacción por HPLC-MS (ESI +). Tras observar el ion molecular del producto hidrolizado y la desaparición del producto con Boc se evapora el disolvente a presión reducida, y se lava con H<sub>2</sub>O y DCM, se evapora la fase acuosa y se seca en alto vacío, obteniéndose 171 mg (0.35 mmol) de producto hidrolizado **38** con rendimiento cuantitativo.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	$\delta$ =1.79-1.70 (m, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ), 1.87-1.79 (m, 2H, CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O), 2.22 - 2.13 (m, 2H, CCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH), 2.36 (t, $J$ = 7.4 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH), 3.06 - 2.96 (m, 2H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ), 3.26 (t, $J$ = 7.0 Hz, 2H, CCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONHCH <sub>2</sub> ), 3.44 - 3.35 (m, 2H, CCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONHCH <sub>2</sub> ), 3.49 (t, $J$ = 6.1 Hz, 2H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ), 3.59-3.51 (m, 10 H, CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O), 7.91 (d, $J$ = 8Hz, 1H, CHAr), 8.01 (t, $J$ = 7.6 Hz, 1H, CH Ar), 8.05(fs, 2H, CH Ar), 8.14(d, $J$ = 12Hz, 2H, Ar), 8.2-8.17 (dd, 2H, $J^2$ = 12Hz, $J^3$ = 4Hz CCCHCHCCHCHCHC), 8.35(d, $J$ = 9.6Hz, 1H Ar).
<sup>13</sup> C-RMN (APT) (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	$\delta$ = 28.0, 29.2, 30.3, 30.5, 33.8, 36.8, 37.8, 40.2, 69.7, 70.4, 70.9, 71.0, 71.3, 124.4, 125.9, 125.9, 127.1, 127.8, 128.4, 128.6, 129.9, 131.4, 132.3, 132.9, 137.3, 160.4, 175.4 ppm
FT-IR (ATR)	$\nu$ = 2940, 2876, 2724, 2551, 1781, 1647, 1636, 1603, 1588, 1557, 1509, 1435, 1203, 1159 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (ESI <sup>+</sup> TOF-MS)	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> M <sup>•+</sup> calculado: 490.2832 encontrado [M+H] <sup>+</sup> : 491.2895

***N*-(1-bromo-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azaexadecan-16-il)-4-(piren-1-il)butanamida (39)**

A una disolución de 554 mg (1.128 mmol) de *N*-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida **38** en 10 mL de CH<sub>3</sub>CN seco se le añaden a 0 °C en atmosfera de argón, 0.472 mL de Et<sub>3</sub>N seca y a continuación una mezcla de 0.12 mL (1.354 mmol) de bromuro de bromoacetilo en 3 mL de CH<sub>3</sub>CN seco manteniendo la temperatura a 0°C. Después de la adición se eleva la temperatura a 25 °C y se mantiene con agitación durante 48 horas. El crudo de reacción se purifica por extracción con lavados sucesivos con H<sub>2</sub>O, una disolución acuosa de HCl 2N, H<sub>2</sub>O y finalmente una disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> se seca la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el crudo de reacción por columna cromatográfica sobre gel de sílice en gradiente de polaridad (de 98/2/0.2 hasta 96/4/0.4 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH) obteniéndose 119.7 mg (0.196 mmol) de **39** con un rendimiento del 17%.

**<sup>1</sup>H-RMN**(400MHz, CD<sub>3</sub>OD)

δ = 1.74 - 1.58 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>Br, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.20 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 2.28 (t, *J* = 7.3 Hz, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 2.48 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>Br), 3.29 - 3.12 (m, 6H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CONHCH<sub>2</sub>), 3.46 - 3.29 (m, 12H CH<sub>2</sub>O), 3.79 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br) 7.77 (dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.92 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 3H), 8.04 - 7.97 (m, 2H), 8.11 - 8.04 (m, 2H), 8.21 (dd, *J* = 9.3, 1.2 Hz, 1H)

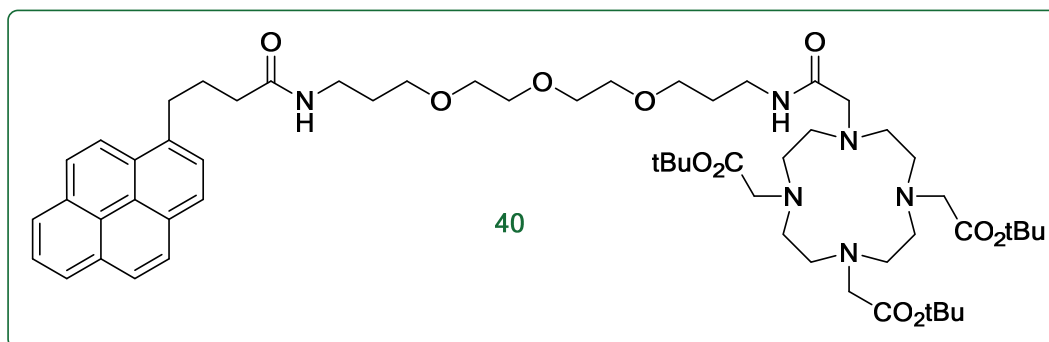
**<sup>13</sup>C-RMN**(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

δ = 30.3, 33.7, 36.7, 37.8, 38.4, 69.6, 69.8, 70.9, 71.0, 71.3, 124.3, 125.7, 125.8, 125.9, 126.1, 127.6, 128.3, 128.4, 129.8, 131.2, 132.7, 137.2, 169.1, 175.6 ppm

**Masa**

C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M]<sup>+</sup>: 633.2, [M+2]<sup>+</sup> 635.2

**2,2',2''-(10-(2,18-dioxo-21-(piren-1-il)-7,10,13-trioxa-3,17-diazaenicosil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacetato de tri-*terc*-butilo (40)**



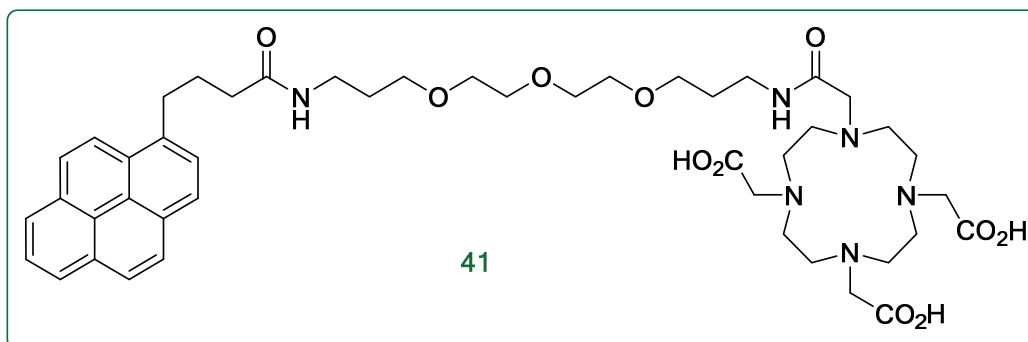
A una mezcla de 102 mg (0.198 mmol) de **27** y de 75 mg de  $K_2CO_3$  en 10 mL de  $CH_3CN$ , en atmosfera de argón, se le añade una disolución de 110 mg (0.179 mmol) de **39** en 3 mL de DMF. Se mantiene con agitación en atmósfera de argón durante 12 horas. Se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el crudo por extracción con  $H_2O$  y  $CH_2Cl_2$ , se seca la fase orgánica sobre  $MgSO_4$  anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el crudo de reacción por columna cromatográfica sobre gel de sílice en gradiente de polaridad (de 95/5/0.5 hasta 9/1/0.1 de  $CH_2Cl_2/CH_3OH/NH_4OH$ ) obteniéndose 62.7 mg (0.06 mmol) (33.5%) de **40**.

**$^1H$ -RMN** (400MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  = 1.45 (s, 18H), 1.47 (s, 9H), 1.86 - 1.68 (m, 6H), 3.15 - 1.85 (m, 26H), 3.23 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 3H), 3.29 (s, 2H), 3.49 - 3.37 (m, 6H), 3.62 - 3.49 (m, 12H), 7.94 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 8.03 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 8.08 (d,  $J$  = 0.9 Hz, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.19 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 8.24 - 8.20 (m, 2H), 8.38 (d,  $J$  = 9.3 Hz, 1H) ppm

**$^{13}C$ -RMN** (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  = 28.4, 29.2, 30.5, 30.7, 33.8, 36.8, 37.7, 37.9, 48.3, 48.5, 48.7, 56.6, 57.1, 69.9, 71.2, 82.6, 82.7, 124.5, 125.9, 126.0, 127.1, 127.8, 128.6, 132.8, 137.5, 173.0, 173.9, 174.3, 175.6 ppm

**Masa ESI(+)**  $C_{58}H_{88}N_6O_{11}$   $[M]^+$ : 1045.6  
Simple Cuad

**Ácido 2,2',2''-(10-(2,18-dioxo-21-(piren-1-il)-7,10,13-trioxa-3,17-diazaenicosil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacético (41)**<sup>194</sup>

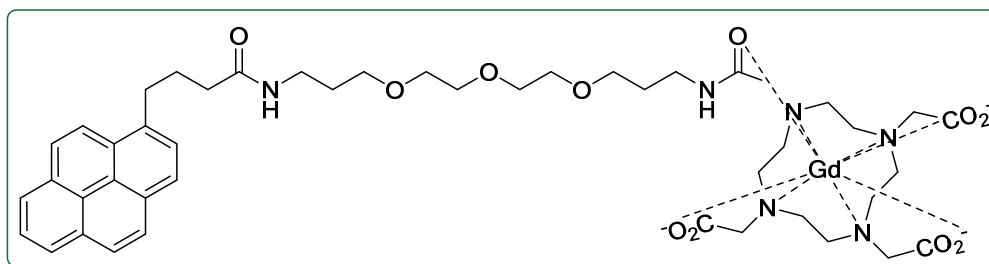


Una mezcla de 63.4 mg (0.06 mmol) de **40** en 564 mg (6 mmol) de fenol se calienta a 60°C hasta completa disolución de fenol. Posteriormente se añaden 0.12 mL de HCl 35% (3.9 mmol) y se mantiene con agitación a 60°C durante 4 horas. Se sigue el curso de la reacción por HPLC-MS. Se purifica el crudo de reacción por extracción con H<sub>2</sub>O/Et<sub>2</sub>O, para eliminar el fenol, posteriormente se extrae la fase acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, finalmente se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose 173.9 mg de producto hidrolizado **41** con rendimiento cuantitativo.

<sup>1</sup> H-RMN (400MHz, CD <sub>3</sub> OD)	δ=1.40 - 1.20 (m, 4H ), 1.74 (dt, <i>J</i> = 20.3, 6.4 Hz, 8H), 2.16 (p, <i>J</i> = 7.6 Hz, 4H), 2.37 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 3H), 3.30 - 3.19 (m, 8H), 3.58 - 3.35 (m, 18H), 3.66 (s, 1H), 7.92 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 8.09 - 7.97 (m, 4H), 8.24 - 8.12 (m, 3H), 8.36 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H) ppm
<sup>13</sup> C-RMN (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	δ = 29.2, 30.2, 30.4, 33.8, 36.8, 37.9, 37.9, 69.9, 71.1, 71.4, 124.5, 125.9, 126.2, 127.7, 128.5, 129.9, 132.3, 132.8, 137.4, 175.8 ppm
Masa	C <sub>46</sub> H <sub>64</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub> :[M+H] <sup>+</sup> +876.4

<sup>194</sup> Torii, S.; Tanaka, H.; Taniguchi, M.; Kameyama, Y.; Sasaoka, M.; Shiroy, T.; Kikuchi, R.; Kawahara, I.; Shimabayashi, A.; Nagao, S. Deprotection of Carboxylic Esters of Beta-Lactam Homologs - Cleavage of Para-Methoxybenzyl, Diphenylmethyl, and Tert-Butyl Esters Effected by A Phenolic Matrix. *Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56 (11), 3633-3637.

**2,2',2''-(10-(2,18-dioxo-21-(piren-1-il)-7,10,13-trioxa-3,17-diazaenicosil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacétato de Gadolinio (III) (22)**<sup>195</sup>



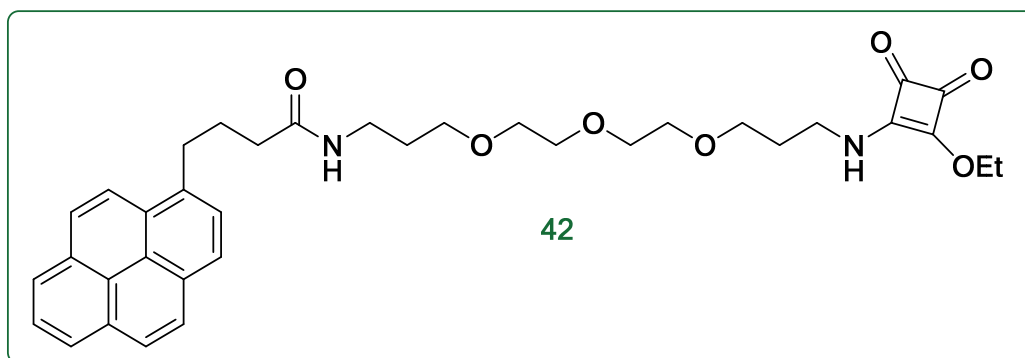
A una disolución acuosa de 35.3 mg (0.04 mmol) de **23** se le añaden 22.3 mg (0.06 mmol) de tricloruro de gadolinio hexahidrato. Tras subir el pH a 7.02 se mantiene con agitación a 60°C durante 24 horas. Se sigue el curso de la reacción por HPLC-MS, confirmándose la formación del complejo. Se elimina el Gd en exceso subiendo el pH a 8 para favorecer la formación y precipitación de hidróxido de gadolinio que se elimina centrifugando durante 25 minutos a 3000 revoluciones por minuto. Se realiza el test colorimétrico de naranjo de xilenol en tampón de urotropina para verificar ausencia de gadolinio libre, se encuentra Gd y se opta por purificar el crudo a través de una columna de chelex en un tampón de TRIS (0.5M) a pH 7.03. Se evapora el agua de la fracción de interés para obtener 284.3 mg de complejo **2**. Aunque se observa el ion molecular, tanto por Evans, como por digestión clorhídrica no se observa presencia de Gd(III) en el complejo. Se ha intentado nuevamente la complejación sin obtener resultados esperados.

FT-IR (ATR)	$\nu = 2940, 2876, 2724, 2551, 1781, 1647, 1636, 1603, 1588, 1557, 1509, 1435, 1203, 1159 \text{ cm}^{-1}$
Masa ESI (+)	$\text{C}_{46}\text{H}_{61}\text{GdN}_6\text{O}_{11} \cdot [\text{M}+\text{H}]^+ 1032.37, [\text{M}+\text{Na}] 1054.35$
Simple Cuad	$[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 516.70$

<sup>195</sup> Rudovsky, J.; Botta, M.; Hermann, P.; Koridze, A.; Aime, S. Relaxometric and solution NMR structural studies on ditopic lanthanide(III) complexes of a phosphinate analogue of DOTA with a fast rate of water exchange. *Dalton Transactions* **2006**, (19), 2323-2333.



***N*-(3-(2-(2-(3-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propoxi)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida (42)**



A una disolución de 772 mg de *N*-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida **38** en 10 mL de EtOH se le añade lentamente a 0°C una mezcla de 126 µL (0.85 mmol) de 3,4-dietoxiciclobut-3-ene-1,2-diona en 3 mL de EtOH, se mantiene con agitación a 0°C durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo se sube la temperatura a 25°C y se mantiene con agitación durante 24 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto por cromatografía en columna sobre SiO<sub>2</sub> en condiciones isocráticas (97/3/0.3 de DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) obteniéndose 435.8 mg (0.708 mmol) (45%) de **42**.

**<sup>1</sup>H-RMN**  
(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ = 1.40 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.75 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1.83 (m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.22 (c, *J* = 7.2 Hz, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 2.41-2.27 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 2.56 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 3.58 - 3.27 (m, 18H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.69 (s, 1H), 4.68 (c, *J* = 7.8, 7.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 6.57 (s, 1H) 6.79 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CCHCH Ar), 8 (ft, *J* = 8 Hz, CCCHCHCCHCHCHC Ar), 8.1 (fs, 2H, CH Ar), 8.16 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar) 8.2-8.17 (dd, 2H, *J*<sup>2</sup> = 12 Hz, *J*<sup>3</sup> = 4 Hz CCCHCHCCHCHCHC), 8.35 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H Ar) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN (CPD)**  
(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ = 15.8, 27.6, 28.7, 29.3, 30.1, 32.7, 35.6, 38.1, 43.5, 69.4, 69.6, 69.9, 70.2, 70.3, 123.4, 124.7, 125.0, 125.8, 126.6, 127.4, 128.7, 129.9, 130.8, 131.3, 135.9, 172.3, 173.7, 176.9, 183.0, 189.2 ppm.

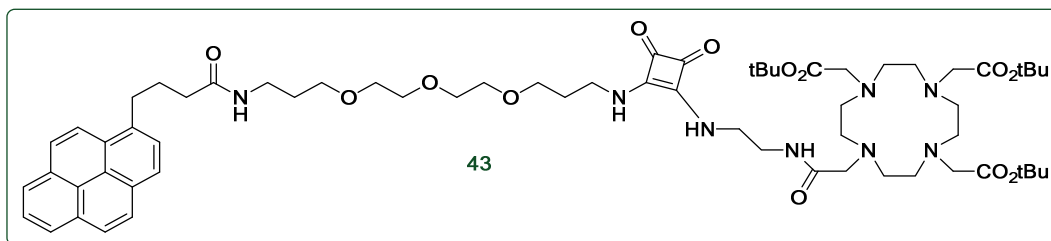
**FT-IR**  
(ATR Diamante)

ν = 3303, 2929, 2866, 1804, 1706, 1606, 1587, 1416, 1344, 1089, 844 cm<sup>-1</sup>

**Masa Exacta**  
(ESI + TOF-MS)

C<sub>36</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> M<sup>•+</sup> calculado: 614.2992  
Encontrado [M+H]<sup>+</sup>: 615.3038

**2,2',2''-(10-(2-((2-((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecane-1,4,7-triil)triacetato de tri-*terc*-butilo (43)**



A una disolución de 472 mg (0.779 mmol) de (4-[(2-aminoetilcarbamoil)metil]-7,10-bis-*terc*-butoxicarbonilmetil-1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-il)-2-acetato de *terc*-butilo 25 en 5 mL de EtOH se le añaden a 0°C 0.5 mL (3.54 mmol) de trietilamina seca, se mantiene con agitación durante 10 minutos y finalmente se adiciona lentamente una mezcla de 438 mg (0.708 mmol) de *N*-(3-(2-(2-(3-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propoxi)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida 42 en 5mL de EtOH, se mantiene con agitación a 0°C durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo se sube la temperatura a 25°C y se mantiene con agitación durante 48 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el crudo de reacción por extracción con una disolución acuosa de KHSO<sub>4</sub> a pH 3 y DCM; se seca la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose 835 mg de producto. Se purifica el crudo por cromatografía en columna sobre SiO<sub>2</sub> en gradiente de polaridad (de 98/2/0.2 hasta 0/90/10 de DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) obteniéndose 518.9 mg (0.439 mmol) (62%) de 43.

**<sup>1</sup>H-RMN**

(400MHz, CD<sub>3</sub>OD, 20 °C)

δ=1.43(s, 18H, ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>NH), 1.45(s, 9H, ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>NH) 1.81-1.77(m 1.76(m,4H,CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.36-1.77 (multiplete ancho, 32H), 3.55-3.49 (m, 10H), 3.63-3.60 m, 2H) 7.89 (d, J= 8Hz, 1H), 7.91(ft, J= 8Hz), 8.00(fs, 2H), 8.02(d, J=12Hz, 2H) 8.18-8.12(dd,2H,J2=12Hz,J3=4Hz), 8.33(d, J=9.6Hz, 1H)

**<sup>1</sup>H-RMN**

(400MHz, CD<sub>3</sub>OD, -25 °C)

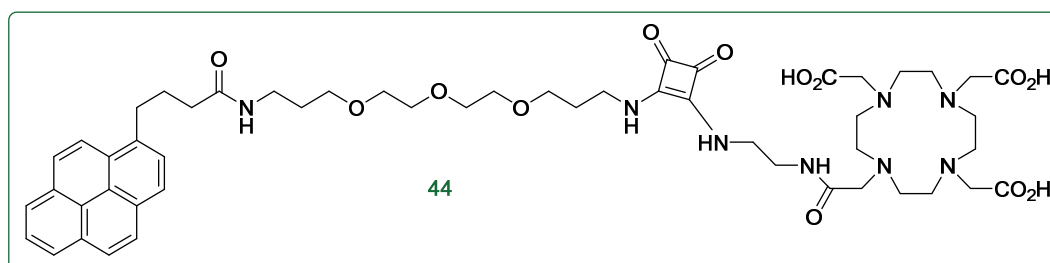
δ=1.38 (s, 9H, ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>NH), 1.40 (s, 18H, CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>NH), 1.61 - 1.46 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1.82 - 1.61 (m, 4H), 2.66 - 1.97 (m, 10H), 3.04 - 2.89 (m, 1H), 3.30 - 3.17 (m, 5H), 3.57 - 3.36 (m, 9H), 3.62 (d, J= 18.7 Hz, 2H), 3.90 - 3.73

**<sup>13</sup>C-RMN**(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD  
20°C)(m, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 14.7 Hz, 2H), 8.22 - 8.08 (m, 3H), 8.32 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H) ppm $\delta = \delta = 28.4, 29.3, 30.4, 32.1, 33.8, 36.9, 37.9, 41.5, 42.6, 44.8, 56.6, 57.0, 69.1, 69.9, 71.1, 71.4, 82.6, 82.7, 124.6, 125.9, 126.1, 126.2, 127.2, 127.8, 128.5, 128.6, 129.9, 131.3, 132.3, 132.8, 137.5, 169.5, 173.6, 174.2, 175.6, 183.3$  ppm**FT-IR**

(ATR Germanio)

 $\nu = 3232, 2930, 2864, 1784, 1727, 1672, 1603, 1533, 1451, 1386, 1306, 1228, 1162, 1106, 850$  cm<sup>-1</sup>**Masa Exacta**

(ESI + TOFMS)

C<sub>64</sub>H<sub>94</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub> M<sup>•+</sup> calculado: 1182.6940encontrado: [M+H]<sup>+</sup> 1183.7037; [M+2H/2]<sup>2+</sup> 592.3552**Ácido 2,2',2''-(10-(2-((2-((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacético (44)<sup>194</sup>**

Una mezcla de 179.5 mg (0.151 mmol) de 43 en 1421 mg (15.1 mmol) de fenol se calienta a 60°C; hasta completa disolución de fenol. Posteriormente se añaden 0.552 mL de HCl 35% (18.12 mmol) y se mantiene con agitación a 60°C durante 4 horas. Se sigue el curso de la reacción por cromatografía en capa fina. Se purifica el crudo de reacción por extracción con H<sub>2</sub>O/Et<sub>2</sub>O, para eliminar el fenol, posteriormente se extrae la fase acuosa con DCM, finalmente se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose 173.9 mg de producto hidrolizado 44 con rendimiento cuantitativo.

**<sup>1</sup>H-RMN**(400MHz, CD<sub>3</sub>OD,  
25 °C)
 $\delta = 1.38 - 1.26$  (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH),  $1.85 - 1.70$  (m, 4H),  $2.17$  (m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O),  $2.17$  (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH),  $2.24 - 2.11$  (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH),  $2.41 - 2.27$  (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH),  $3.72 - 3.36$  (m, 18H) CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONHCH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>,

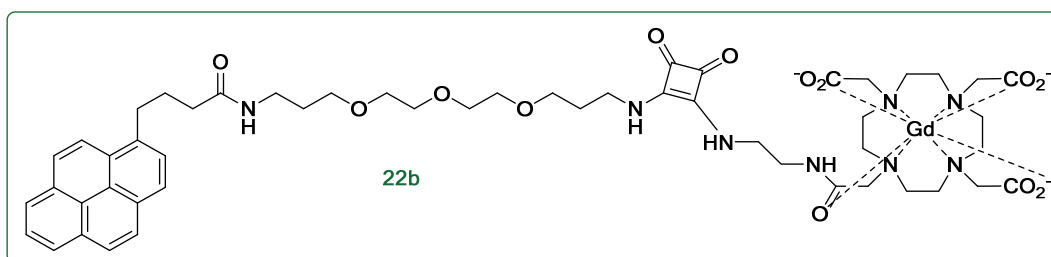
<sup>194</sup> Torii, S.; Tanaka, H.; Taniguchi, M.; Kameyama, Y.; Sasaoka, M.; Shiroy, T.; Kikuchi, R.; Kawahara, I.; Shimabayashi, A.; Nagao, S. Deprotection of Carboxylic Esters of Beta-Lactam Homologs - Cleavage of Para-Methoxybenzyl, Diphenylmethyl, and Tert-Butyl Esters Effected by A Phenolic Matrix. *Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56 (11), 3633-3637.

<sup>13</sup>C-RMN (APT)  
(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  
FT-IR (ATR)

Masa Exacta  
(ES-API(+ y-) +  
QTOF)

CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 7.92 (d, J = 7.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CCHCH Ar), 8.11 - 7.97 (m, 3H, CCCHCHCCHCHCHC Ar), 8.24 - 8.12 (m, 4H, CH Ar), 8.36 (d, J = 9.3 Hz, 1H, CH Ar)  
δ = 29.2, 30.3, 31.8, 33.9, 36.8, 38.1, 41.7, 69.9, 71.1, 71.4, 124.5, 126.0, 127.1, 127.8, 128.6, 130.0, 131.8, 132.8, 176.1  
ν = 3330, 3316, 3303, 3288, 3251, 3085, 2933, 1728, 1667, 1662, 1587, 1539, 1433, 1349, 1217, 1086, 848 cm<sup>-1</sup>  
C<sub>52</sub>H<sub>70</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub> M<sup>+</sup> calculado: 1014.5062  
Encontrado: [M-H]<sup>-</sup> 1013.5048  
[M-2H+Na]<sup>+</sup> 1035.4881

**2,2',2''-(10-(2-((2-((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaooctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecane-1,4,7-triil)triacetato de Gadolinio (III) (22b)**<sup>195,196</sup>



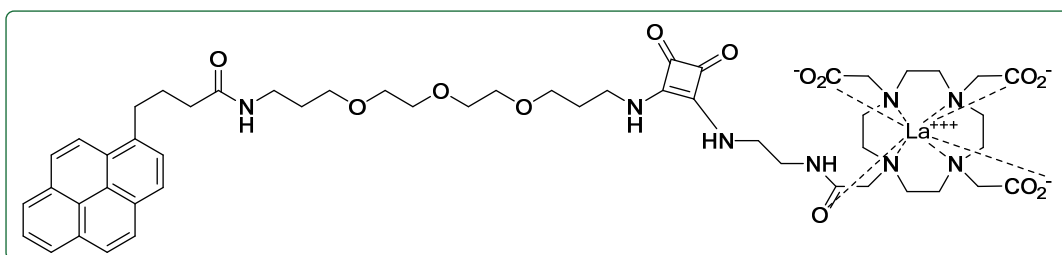
A una disolución acuosa de 147.4 mg (0.145 mmol) de ácido 2,2',2''-(10-(2-((2-((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaooctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacético **44** se le añaden 81 mg (0.217 mmol) de tricloruro de gadolinio hexahidrato. Tras llevar el pH a 7.02 se mantiene con agitación a 60°C durante 24 horas. Se sigue el curso de la reacción por HPLC-MS confirmándose la formación del complejo. Se elimina el Gd en exceso subiendo el pH a 8 para favorecer la formación y precipitación de hidróxido de gadolinio que se elimina centrifugando durante 25 minutos a 3000 revoluciones por minuto. Se comprueba la ausencia de Gd libre por medio del test colorimétrico de naranja de xilenol en tampón de urotropina. Se evapora el agua obteniéndose 133 mg (0.113 mmol) de complejo de gadolinio **22b** con un rendimiento del 78%.

<sup>195</sup> Rudovsky, J.; Botta, M.; Hermann, P.; Koridze, A.; Aime, S. Relaxometric and solution NMR structural studies on ditopic lanthanide(III) complexes of a phosphinate analogue of DOTA with a fast rate of water exchange. *Dalton Transactions* **2006**, (19), 2323-2333.

<sup>196</sup> Barge, A.; Cravotto, G.; Gianolio, E.; Fedeli, F. How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2006**, 1(5), 184-188.

FT-IR (ATR)	$\nu = 2940, 2876, 2724, 2551, 1781, 1647, 1636, 1603, 1588, 1557, 1509, 1435, 1203, 1159 \text{ cm}^{-1}$
Masa Exacta (ESI+, QTOF)	$\text{C}_{52}\text{H}_{67}\text{N}_8\text{O}_{13}\text{Gd} [\text{M}\cdot]^+$ calculado: 1169.4085 Encontrado $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 1192.3760, $[\text{M}+2\text{Na}]^+/2$ 607.6933

**2,2',2''-(10-(2-((2-((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecane-1,4,7-triil)triacetato de Lantano (III)<sup>196</sup> (45)**



A una disolución de 23.8 mg (0.023 mmol) de **44** en 19 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q (pH inicial de 2.35) se ajusta el pH a 6.7 con 2.4 mL de NaOH (0.1 y 1 N) y se le añaden 0.5 mL de una disolución acuosa de 3.25 mg, (0.00875 mmol, 0.25 eq-mol) de tricloruro de lantano heptahidratado (pH 5.24). Se añaden 15  $\mu\text{L}$  de 1M NaOH (pH = 6.45) y se mantiene con agitación a 60 °C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se deja enfriar a 25 °C y se sigue el curso de la complejación a través del test colorimétrico de naranja de xilenol en tampón acetato (50 mM) a pH = 5.8, hasta que no se observa viraje, se mide nuevamente el pH (5.9) y se añaden los 9.5 mg (0.75 eq mol) que quedaban de cloruro de lantano heptahidratado. Se comprueba nuevamente el pH y tras observar que está a 4.01 se añaden 15  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 M obteniendo un pH de 6.95. Se mantiene la reacción con agitación a 60 °C durante 12 horas. Se vuelve a comprobar ausencia de La libre por medio del test colorimétrico de naranja de xilenol en tampón acetato. Se comprueba la presencia del complejo **45** por HPLC-MS (ESI -).

<sup>196</sup> Barge, A.; Cravotto, G.; Gianolio, E.; Fedeli, F. How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2006**, 1 (5), 184-188.

<sup>1</sup>H-RMN

(400MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C)

δ = 1.38 - 1.26 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1.85 - 1.70 (m, 4H), 2.17 (m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.17 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 2.24 - 2.11 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 2.41 - 2.27 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 3.72 - 3.36 (m, 18H) CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONHCH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 7.93 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CCHCH Ar), 8.01 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, CCCHCHCCHCHCHC Ar), 8.06 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H CH Ar), 8.24 - 8.13 (m, 4H, CH Ar), 8.36 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, CH Ar)

<sup>13</sup>C-RMN (APT)

(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

δ = 29.2, 30.3, 32.1, 33.8, 36.8, 37.9, 39.0, 40.9, 42.7, 43.1, 62.3, 69.1, 69.9, 71.1, 71.4, 124.5, 126.2, 126.9, 127.8, 128.2, 130.0, 131.4, 132.8, 134.3, 134.8, 176.7, 177.4, 178.9

FT-IR (ATR)

ν = 2940, 2876, 2724, 2551, 1781, 1647, 1636, 1603, 1588, 1557, 1509, 1435, 1203, 1159 cm<sup>-1</sup>

Masa Exacta

(ESI+, QTOF)

C<sub>52</sub>H<sub>67</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>La [M•]<sup>+</sup> calculado: 1150.3891

Encontrado [M+Na]<sup>+</sup>: 1173.3648,

[M+2Na]<sup>+</sup>/2 598.1841

#### 6.6.4. Derivados de acoplamiento de Suzuki

##### Intento de obtención de Ácido 4-(piren-1-il)benzoico<sup>200</sup>

Una mezcla de 200 mg (0.81mmol) de ácido pirenilborónico (49), 201.6 mg (0.81 mmol) de ácido p-iodobenzóico (50), 2.5 mL de una disolución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 M) en 1.65 mL de EtOH y en 5 mL de tolueno a 25 °C, bajo atmósfera de argón, se desgasifica durante dos horas. Al cabo de ese tiempo se añaden 94 mg (0.08) mmol de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y se mantiene con agitación, bajo atmósfera de Argón, a 100°C durante 24 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC y no se observa la formación de un nuevo producto. La reacción presenta mucho producto insoluble.

##### Intento de obtención de 4-(piren-1-il)anilina(52)

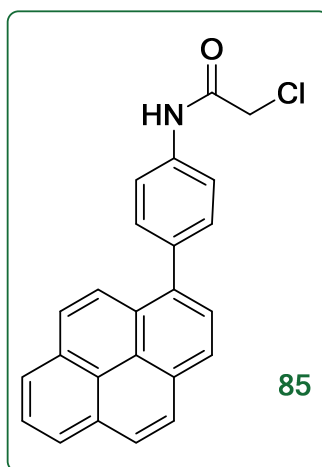
Método: Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, EtOH/Tol<sup>200</sup>

Una mezcla de 200 mg (0.81mmol) de ácido pirenilborónico (49), 140 mg (0.81 mmol) de 4-bromoanilina (51), 2.5 mL de una disolución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 M) en 1.65 mL de EtOH y en 5 mL de tolueno a 25 °C, bajo atmósfera de Argón, se desgasifica durante dos horas. Al cabo de ese tiempo se añaden 94 mg (0.08) mmol de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y se mantiene con agitación, bajo atmósfera de Argón, a 100°C durante 24 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC. La reacción presenta mucho producto insoluble y el aspecto ha cambiado de amarillo turbio a rojo intenso. El crudo de reacción se purifica por extracción con DCM y H<sub>2</sub>O, se elimina el precipitado presente por centrifugación (4000 rpm durante 10 min) y se vuelve a extraer con H<sub>2</sub>O (20 mL x 3). Se seca la fase orgánica sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el crudo por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de Éter de Petróleo/ DCM en gradiente de polaridad (de 7/3 hasta 9/1), obteniéndose 67 mg (0.22 mmol) de producto de acoplamiento con un rendimiento del 22%.

<sup>200</sup> Tao, S.; Zhou, Y.; Lee, C. S.; Lee, S. T.; Huang, D.; Zhang, X. A triphenylamine derivative as a single-emitting component for highly-efficient white electroluminescent devices. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18* (33), 3981-3984.

<sup>1</sup> H-RMN (400MHz, CDCl <sub>3</sub> , 25 °C)	δ = 3.84 (s ancho, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.90 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H, CHCNH <sub>2</sub> ), 7.48 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H, CHCPireno), 8.49 - 7.81 (m, 9H Pireno) ppm
<sup>13</sup> C-RMN (APT) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 115, 124.6, 124.8, 125.6, 125.8, 127.1, 127.4, 127.6, 128.6, 130.2, 131.1, 131.5, 145.7 ppm
FT-IR (ATR)	ν = 3468, 3375, 3037, 2921, 2851, 1617, 1523, 1497, 1457, 1412, 1281, 1180, 966 cm <sup>-1</sup>
Masa (ES-API(+))	C <sub>22</sub> H <sub>15</sub> N calculado [M•] <sup>+</sup> : 293.1204 encontrado [M + H] <sup>+</sup> : 294.3

## 2-cloro-*N*-(4-(piren-1-il)fenil)acetamida (85)



A una mezcla de 60 mg (0.2 mmol) de 4-(piren-1-il)anilina (52), 85 μL (0.6 mmol) de Et<sub>3</sub>N seca en 3 mL de DCM seco se le añade lentamente a -10 °C, bajo atmósfera de nitrógeno, una disolución de 18 μL (0.22 mmol) de cloruro de cloroacetilo en 1 mL de DCM seco. Se mantiene con agitación a -10 °C durante 1 hora, seguidamente se eleva la temperatura a 25 °C y se mantiene con agitación durante 12 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el crudo de reacción por cromatografía en columna sobre SiO<sub>2</sub> en condiciones isocráticas, empleando como eluyente una mezcla de DCM/Éter de Petróleo (9/1). Se obtienen 9 mg de producto 85 con un rendimiento de 11.9%.

<sup>1</sup> H-RMN (400MHz, CDCl <sub>3</sub> , 25 °C)	δ = 4.29 (s, 2H, CH <sub>2</sub> CINH <sub>2</sub> ), 7.66 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H, CHCNH <sub>2</sub> ), 7.77 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H, CHCPireno), 8.29 - 7.81 (m, 9H Pireno) ppm
Masa (ES-API(+))	C <sub>24</sub> H <sub>16</sub> ClNO calculado [M•] <sup>+</sup> : 369.092 encontrado [M + H] <sup>+</sup> : 370.1



### Intento de obtención de 4-(piren-1-il)anilina (52)

Método:  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ; iPrOH/ $\text{H}_2\text{O}$

Una mezcla de 790 mg (3.21 mmol) de ácido pirenilborónico (49), 540 mg (2.92 mmol) de 4-bromoanilina (51), 12.5 mL de una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}$ /iPrOH (1/4) a 25 °C, bajo atmósfera de nitrógeno, se desgasifica durante dos horas. Se mantiene con agitación a 25°C pero no se observa la disolución del ácido borónico, se añaden 30 mL de iPrOH y se eleva la temperatura a 60 °C, una vez que la mezcla de reacción aparece transparente se le añaden 497 mg (3.6 mmol) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y 148 mg (0.13) mmol de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  y se mantiene con agitación, bajo atmósfera de nitrógeno, a 70°C durante 5 horas y 12 horas a 25 °C. Al crudo de reacción se le añaden 25 mL de una disolución acuosa de HCl 2N y purifica por extracción con DCM y  $\text{H}_2\text{O}$ , se elimina el precipitado presente por centrifugación (4000 rpm durante 10 min) y se vuelve a extraer con  $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL x 3). Se seca la fase orgánica sobre  $\text{NaSO}_4$  anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el crudo por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de Éter de Petróleo / DCM en condiciones isocráticas (4/6), obteniéndose 101 mg (0.34 mmol) de producto de acoplamiento con un rendimiento del 11.9 %.

### Intento obtención N-(4-bromofenil)acetamida (53)

Una mezcla de 500 mg (2.9 mmol) de 4-bromoanilina (51), 0.27 mL (2.9 mmol) de anhídrido acético, 0.26 mL de ácido acético glacial se mantiene con agitación a reflujo durante 45 minutos. Transcurrido ese tiempo se descarga la reacción muy lentamente en 15 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Se enfría en baño de hielo. Se observa la formación de un precipitado que se filtra y se seca en alto vacío. Se analiza por RMN pero no se observan las señales esperadas.

### Intento obtención N-(4-bromofenil)acetamida (53)

A una mezcla de 500 mg (2.9 mmol) de 4-bromoanilina en 3 mL de anhídrido acético se le añaden 50 mg (10 % en peso) de DMAP. Se

mantiene la mezcla de reacción con agitación durante una hora. Se sigue el curso de la reacción por TLC observando solo producto de partida. Se purifica el crudo por extracción líquido líquido añadiendo a la reacción *tert*-ButOMe y lavando con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 5 mL) y finalmente con H<sub>2</sub>O (2 x 5 mL), se seca la fase orgánica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión reducida. En RMN se confirma lo que se había observado en TLC: no hay formación de la acetamida, solo hay producto de partida.

### *N*-(4-bromofenil)acetamida (53)<sup>202,227</sup>

A una mezcla de 1000 mg (5.8 mmol) de 4-bromoanilina (51) en 6 mL de anhídrido acético recién destilado se le añaden 100 mg (10 % en peso respecto a 4Br-anilina) de DMAP. Se mantiene la mezcla de reacción con agitación durante dos horas. Se observa la formación de un precipitado, se filtra y se seca en alto vacío. Se han obtenido 876.7 mg (4.09 mmol) de producto deseado 53 con un rendimiento del 70%.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> 25 °C)	δ = 2.18 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 7.23 (s ancho, 1H,NH), 7.42 (m, 4H, CH Ar) ppm
<sup>13</sup> C-RMN ( <sup>13</sup> C APT) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 24.6, 116.9, 121.3, 136.9, 168.2 ppm
Masa (ESI-simple Quad)	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> BrNO calculado: 212.9789 encontrado: [M + H] <sup>+</sup> : 213.9

### Intento de obtención de *N*-(4-(piren-1-il)fenil)acetamida

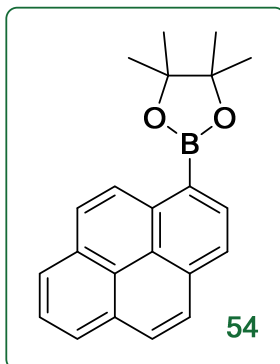
A una mezcla de 200 mg (0.93 mmol) de *N*-(4-bromofenil)acetamida (53) en H<sub>2</sub>O/ iPrOH (4/1) a 25 °C, se le añade una mezcla caliente de 253 mg (1.03 mmol) de ácido pirenilborónico en 3 mL de iPrOH. Se eleva la temperatura a 75°C y se añaden 161 mg (1.17 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 43.2 mg (0.03 mmol) de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y se mantiene con agitación durante 6 horas. Al

<sup>202</sup> Rostami, A.; Colin, A.; Li, X. Y.; Chudzinski, M. G.; Lough, A. J.; Taylor, M. S. N,N'-Diarylsquaramides: General, High-Yielding Synthesis and Applications in Colorimetric Anion Sensing. *Journal Organic Chemistry* **2010**, *75*, 3983-3992.

<sup>227</sup> Niknam, K.; Saberi, D. Silica-bonded N-propyl sulfamic acid as an efficient catalyst for the formylation and acetylation of alcohols and amines under heterogeneous conditions. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50* (37), 5210-5214.

cabo de ese tiempo se sigue el curso de la reacción por TLC y solo se observa la presencia de los productos de partida y ningún producto de acoplamiento.

#### 4,4,5,5-tetrametil-2-(piren-1-il)-1,3,2-dioxaborolano (54)<sup>201</sup>



A una suspensión de 1 g (4.06 mmol) de ácido 1-pirenilborónico (49) en 100 mL de éter dietílico se le añaden 1.556 g (13.17 mmol) de pinacol. Se eleva la temperatura a 40 °C y se deja con agitación durante 45 minutos desde que la mezcla de reacción aparece homogénea y transparente. Al cabo de este tiempo se comprueba el curso de la reacción por TLC y tras su observación se decide mantenerla a 25 °C durante 12 horas. Se evapora el disolvente a presión reducida y se purifica el crudo de reacción por cromatografía en columna sobre SiO<sub>2</sub> en gradiente de polaridad Hexano/AcOEt (de 100/0 hasta 98/2) obteniéndose 1.006 g (3.05 mmol) de 4,4,5,5-tetrametil-2-(piren-1-il)-1,3,2-dioxaborolano **54** con un rendimiento del 75%.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> 25 °C)	δ = 1.50 (s, 12H, CH <sub>3</sub> ), 8.01 (t, J = 7.6 Hz, 1H, BCCH Ar), 8.14 - 8.06 (m, 2H, Ar), 8.24 - 8.15 (m, 4H, Ar), 8.55 (d, J = 7.7 Hz, 1H, Ar), 9.08 (d, J = 9.2 Hz, 1H, Ar) ppm
<sup>13</sup> C-RMN (CPD) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 25.0, 83.8, 124.0, 124.3, 124.5, 125.1, 125.3, 125.6, 127.4, 127.7, 127.9, 128.5, 130.7, 131.0, 133.4, 133.8, 136.4
FT-IR (ATR-Ge)	ν = 2971, 2930, 1595, 1509, 1369, 1353, 1304, 1281, 1270, 1138, 1127, 1109, 1083, 1034, 970, 959, 85, 842 cm <sup>-1</sup>
Masa	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> BO <sub>2</sub> calculado: 328.1635

<sup>201</sup> Beinhoff, M.; Weigel, W.; Jurczok, M.; Rettig, W.; Modrakowski, C.; Br++dgam, I.; Hartl, H.; Schluter, A. Synthesis and Spectroscopic Properties of Arene-Substituted Pyrene Derivatives as Model Compounds for Fluorescent Polarity Probes. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001* (20), 3819-3829.

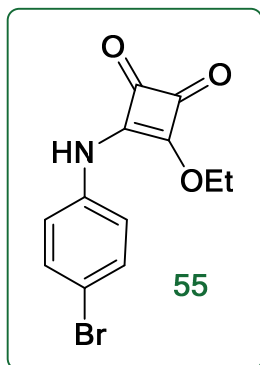
(ESI-simple Quad) encontrado:  $[M + H]^+$ : 329.1

### Intento de obtención de 4-(piren-1-il)anilina (52)

Se prepara una mezcla de 261.3 mg (1.52 mmol) de 4-bromoanilina (51), 502 mg (1.52 mmol) de 4,4,5,5-tetrametil-2-(piren-1-il)-1,3,2-dioxaborolano (54), 20 mL de una disolución acuosa de NaOH 1M en 40 mL de tolueno y se desgasifica burbujeando helio durante 45 minutos. Transcurrido ese tiempo se añaden 10 mg (2% en peso con respecto al ácido borónico) de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ . Se deja la reacción a reflujo y con agitación durante 20 horas. Se deja enfriar a temperatura ambiente, se separan las dos fases y se lava la fase acuosa con tolueno, se forma una gran emulsión. Se centrifuga y se filtra sobre celita. Se reúnen las fases orgánicas, se secan con sulfato de magnesio anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el crudo de reacción por cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente de polaridad empleando como eluyente una mezcla Hexano/AcOEt (de 98/2 hasta 9/1). Se vuelve a cromatografiar en columna disminuyendo la polaridad de la mezcla del eluyente (100% Hexano hasta 99/1 Hexano/AcOEt). Se obtienen 86 mg (0.29 mmol) de producto de acoplamiento de Suzuki 52 con un rendimiento del 19%.

### Intento de obtención de 4-(piren-1-il) anilina con $\text{Na}_2\text{CO}_3$

Se repite la reacción anterior empleando en vez de NaOH, una disolución acuosa 1M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pero en el análisis al HPLC-MS no se observa la formación del producto de acoplamiento de Suzuki. Método: columna RP18, elución en gradiente de polaridad: MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% ácido fórmico) (de 60% hasta 95 % en 15 minutos), se detectan los siguientes picos (ESI-MS (+)): 2.84 minutos: 170, 172, atribuido a p-bromoanilina ( $M$ ,  $M+2$ ); 4.734 minutos, 8.819 minutos 279.1, 301 atribuido a 1-fenilpireno.

3-((4-bromofenil)amino)-4-etoxiciclobut-3-ene-1,2-diona (**55**)<sup>202</sup>

Una mezcla de 0.88 mL (0.6 mmol) de 3,4-dietoxiciclobut-3-en-1,2-diona, 181 mg (0.5 mmol) de  $\text{Zn}(\text{OTf})_2$  en 5 mL de etanol se mantiene con agitación durante 15 minutos y se le añaden 860 mg (5 mmol) de 4-bromo anilina. Se mantiene con agitación a 25 °C durante una hora, se observa la formación de un precipitado, que se filtra y se seca en alto vacío. El etanol se deja reaccionar otras 48 horas. Al cabo de ese tiempo se observa la formación de un precipitado, se filtra y se lava tres veces con 25 mL de etanol, se vuelve a filtrar y sumando los dos sólidos se obtienen 998 mg (3.38 mmol) de **55** con rendimiento del 67%.

<sup>1</sup>H-RMN  $\delta$  = 1.42 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.76 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 7.33 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, CH Ar), 7.53 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H, CH Ar), 10.81 (s, 1H, NH), ppm  
 Masa  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrNO}_3$  calculado: 294.9844  
 (ESI-simple Quad) encontrado:  $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 295.9

<sup>202</sup> Rostami, A.; Colin, A.; Li, X. Y.; Chudzinski, M. G.; Lough, A. J.; Taylor, M. S. *N,N'*-Diarylsquaramides: General, High-Yielding Synthesis and Applications in Colorimetric Anion Sensing. *Journal Organic Chemistry* **2010**, 75, 3983-3992.

**Intento de obtención de 3-etoxi-4-((4-(piren-1-il)fenil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona<sup>201</sup>****Método: NaOH**

Se prepara una mezcla de 255 mg (0.88 mmol) de **55**, 290 mg (0.9 mmol) de 4,4,5,5-tetrametil-2-(piren-1-il)-1,3,2-dioxaborolano **54**, 11 mL de una disolución acuosa de NaOH 1M en 22 mL de tolueno y se desgasifica burbujeando helio durante dos horas. Transcurrido ese tiempo se añaden 58 mg (2% en peso) de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. Se deja la reacción a reflujo y con agitación durante 20 horas. Pasado este tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente, y se añaden 10 mL de tolueno y 5 mL de NaOH 1M, se separan las dos fases y lava la fase acuosa con tolueno. Se reúnen las fases orgánicas, se secan con sulfato de magnesio anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Se analizan las dos fases tanto en TLC como en HPLC-MS, no se observa la formación de producto de acoplamiento pero se identifica 4-bromoanilina.

**Método: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>201</sup>**

Se repite la reacción anterior empleando en vez de NaOH, una disolución acuosa 1M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pero del análisis de HPLC-MS no se observa la formación del producto de acoplamiento de Suzuki. Método: columna RP18, elución en gradiente de polaridad: MeOH/H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico) (de 60% hasta 95% en 15 minutos), se detectan los siguientes picos (ESI-MS (+)) en la fase orgánica: 2.84 minutos: 170, 172, atribuido a 4-bromo-anilina (M, M+2), 8.819 minutos 279.1, 301 atribuido a 1-fenilpireno; (ESI-MS (-)) en la fase acuosa se observa un pico correspondiente a 4,4,5,5-tetrametil-2-(piren-1-il)-1,3,2-dioxaborolano a 328.1 (M-).

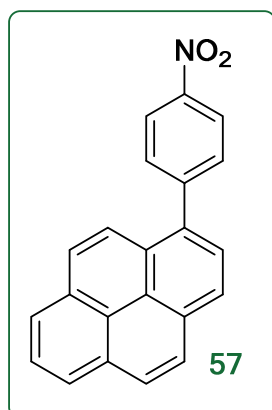
<sup>201</sup> Beinhoff, M.; Weigel, W.; Jurczok, M.; Rettig, W.; Modrakowski, C.; Brüdgam, I.; Hartl, H.; Schlüter, A. Synthesis and Spectroscopic Properties of Arene-Substituted Pyrene Derivatives as Model Compounds for Fluorescent Polarity Probes. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2001 (20), 3819-3829.

### 3,4-dihidroxiiciclobut-3-ene-1,2-diona

Una mezcla de 0.3 mL (3 mmol) de 3,4-dietoxiciclobut-3-ene-1,2-diona, 5 mL de una disolución acuosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M en 10 mL de tolueno ser mantiene a reflujo durante 48 horas. Se siguen el curso de la reacción en HPLC-MS (ESI-MS (-)), observando solamente un pico de masa 113.1 atribuido al producto hidrolizado (M-).

### Intento de obtención de *N*-(4-(piren-1-il)fenil)acetamida

Se prepara una mezcla de 34.5 mg (0.15 mmol) de *N*-(4-bromofenil)acetamida (53), 50 mg (0.15 mmol) de 4,4,5,5-tetrametil-2-(piren-1-il)-1,3,2-dioxaborolano (54), 3 mL de una disolución acuosa de NaOH 1M en 6 mL de tolueno y se desgasifica burbujeando helio durante dos horas. Transcurrido ese tiempo se añaden 10 mg (2% en peso) de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ . Se deja la reacción a reflujo y con agitación durante 20 horas. Se deja enfriar a temperatura ambiente, se observa la formación de una emulsión y de un sólido, se centrifuga y se separan las dos fases. Se analizan las dos fases tanto en TLC como en HPLC-MS, columna RP18, método en gradiente de polaridad: MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% ácido fórmico) (de 60% hasta 95 % en 15 minutos), se detectan los siguientes picos (ESI-MS (+)): 2.84 minutos: 170 y 172 Da, atribuido a p-bromoanilina (M, M+2); 4.734 minutos 214 y 216 Da atribuido a *N*-(4-bromofenil)acetamida, 8.819 minutos 279.1y 301 Da atribuido a 1-fenilpireno. No se obtiene producto de acoplamiento deseado.

1-(4-nitrofenil)pireno (57)<sup>201</sup>

Se prepara una mezcla de 308 mg (1.52 mmol) de 1-bromo-4-nitrobenceno, 500 mg (1.52 mmol) de 4,4,5,5-tetrametil-2-(piren-1-il)-1,3,2-dioxaborolano **54**, 14 mL de una disolución acuosa de carbonato sódico 1M en 30 mL de tolueno y se desgasifica burbujeando helio durante dos horas. Transcurrido ese tiempo se añaden 35.2 mg (0.03 mmol) de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. Se deja la reacción a reflujo y con agitación durante 20 horas. Se deja enfriar a temperatura ambiente, se separan las dos fases y se lava la fase acuosa con tolueno. Se reúnen las fases orgánicas, se secan con sulfato de magnesio anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el crudo de reacción por cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente de polaridad empleando como eluyente una mezcla Hexano/AcOEt (de 100/0 hasta 99/1). Se obtienen 452 mg (1.4 mmol) de producto de acoplamiento de Suzuki **57** con un rendimiento del 92%.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 7.82 (d, J = 8.9 Hz, 2H, CHC <sub>P</sub> Pireno), 7.97 (d, J = 7.9 Hz, 1H, CH Ar), 8.29-8.03 (m, 8H, CH Ar), 8.44 (d, J = 8.9 Hz, 2H, CHCNO <sub>2</sub> ) ppm
<sup>13</sup> C-RMN (CPD) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 122.1, 123.7, 124.2, 124.8, 125.4, 125.7, 126.4, 127.2, 127.3, 128.2, 128.4, 130.8, 131.4
FT-IR (ATR-Ge)	ν = 3040, 2920, 2850, 1891, 1820, 1594, 1509, 1341, 1311, 1244, 1186, 1102, 1006, 981, 848 cm <sup>-1</sup>
Masa (ESI-simple Quad)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>2</sub> calculado [M•] <sup>+</sup> : 328.1635 encontrado: [M + H] <sup>+</sup> 329.1

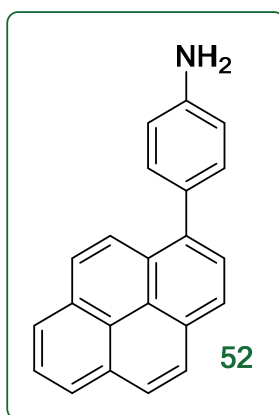
<sup>201</sup> Beinhoff, M.; Weigel, W.; Jurczok, M.; Rettig, W.; Modrakowski, C.; Brüdgam, I.; Hartl, H.; Schlüter, A. Synthesis and Spectroscopic Properties of Arene-Substituted Pyrene Derivatives as Model Compounds for Fluorescent Polarity Probes. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001* (20), 3819-3829.



### Intento de obtención de 4-(piren-1-il)anilina<sup>203</sup>

A una mezcla de 50 mg (0.15 mmol) de 1-(4-nitrofenil)pireno, 55 mg de grafito en 4 mL de EtOH se le añaden 30  $\mu$ L de hidrazina monohidrato. Se eleva la temperatura a 75 °C y se mantiene con agitación durante 12 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC observándose la formación de un nuevo producto pero queda todavía mucho producto de partida, se añaden por lo tanto otros 104 mg de grafito y 90  $\mu$ L de hidrazina monohidrato, se mantiene con agitación a reflujo durante 24 horas. Se sigue por TLC y se observa un aumento en la concentración del producto reducido. Se evapora el disolvente a presión reducida y se purifica el crudo por cromatografía en columna sobre SiO<sub>2</sub> empleando como eluyente una mezcla de Hexano/AcOEt en gradiente de polaridad (de 9/1 hasta 0/10), obteniéndose 9 mg (0.03 mmol) de 4-(piren-1-il)anilina. Los datos espectroscópicos son los mismos que los obtenidos en el método de reducción que emplea SnCl<sub>2</sub>.

### 4-(piren-1-il)anilina (52)<sup>204</sup>



Una disolución de 365 mg (1.128 mmol) de 1-(4-nitrofenil)pireno 57, 1.273.6 mg (5.64 mmol) SnCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O en 15 mL de CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Et se mantiene a

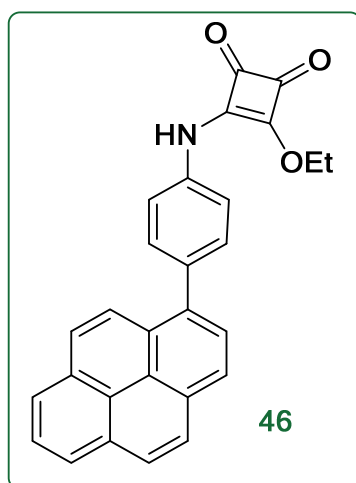
<sup>203</sup> Bullock, J. E.; Carmieli, R.; Mickley, S. M.; Vura-Weis, J.; Wasielewski, M. R. Photoinitiated Charge Transport through pi-Stacked Electron Conduits in Supramolecular Ordered Assemblies of Donor-Acceptor Triads. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131 (33), 11919-11929.

<sup>204</sup> 11. Suryadevara, P. K.; Olepu, S.; Lockman, J. W.; Ohkanda, J.; Karimi, M.; Verlinde, C. L.; Kraus, J. M.; Schoepe, J.; Van Voorhis, W. C.; Hamilton, A. D.; Buckner, F. S.; Gelb, M. H. Structurally Simple Inhibitors of Lanosterol 14  $\alpha$ -Demethylase Are Efficacious In a Rodent Model of Acute Chagas Disease. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52 (12), 3703-3715.

reflujo con agitación durante 5 horas, posteriormente se enfría la reacción hasta alcanzar una temperatura de 25 °C y se mantiene agitando otras 12 horas. Se purifica por extracción con una disolución acuosa de HCl y AcOEt, se seca la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto por cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente de polaridad empleando como eluyente una mezcla de Hexano/Acetato de Etilo (de 9/1 hasta 8/2) obteniéndose 212.5 mg (0.72 mmol) de 4-(piren-1-il)anilina (**52**) con un rendimiento del 64%.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 3.83 (s ancho, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.89 (d, J = 8.5 Hz, 2H, CHCNH <sub>2</sub> ), 7.45 (d, J = 8.5 Hz, 2H, CHCPireno), 8.28 - 7.86 (m, 9H, CH Pireno)
<sup>13</sup> C-RMN (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 115, 124.6, 124.7, 124.8, 125.1, 125.6, 125.8, 127.1, 127.4, 127.6, 127.7, 128.5, 130.1, 131, 131.3, 131.5, 137.9, 145.7 ppm
FT-IR (ATR)	ν = 3468, 3375, 3037, 2921, 2851, 1617, 1523, 1497, 1457, 1412, 1281, 1180, 966 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (ESI-QTOF)	C <sub>22</sub> H <sub>15</sub> N calculado [M•] <sup>+</sup> : 293.1204 encontrado [M + H] <sup>+</sup> : 294.1278

### 3-etoxi-4-((4-(piren-1-il)fenil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (**46**)

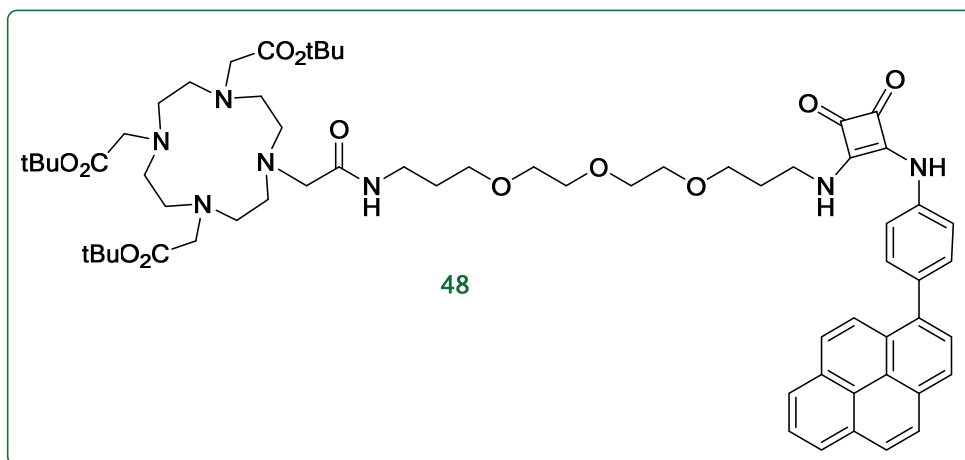


Una mezcla de 61 mL (0.409 mmol) de 3,4-dietoxiciclobut-3-en-1,2-diona, 15 mg (0.041 mmol) de Zn(OTf)<sub>2</sub> en 5 mL de etanol se mantiene con agitación durante 15 minutos y se le añaden 100 mg (0.34 mmol) de 4-(piren-1-il) anilina (**52**). Se mantiene con agitación a 25 °C durante 48 horas. Se observa la formación de un precipitado, se filtra y se lava tres veces con

25 mL de etanol, se vuelve a filtrar y se obtienen 140 mg (0.34 mmol) de 3-etoxi-4-((4-(piren-1-il)fenil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona **46** con rendimiento cuantitativo.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 1.57 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ), 3.87 (s ancho, 1H, NH), 4.95 (q, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H, CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ), 7.52 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H, CHCNH), 7.66 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H, CHCPireno), 8.31 - 7.87 (m, 9H, CH Ar pireno).
<sup>13</sup> C-RMN CPD (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 15.9, 70.6, 118.8, 124.7, 124.8, 125.2, 126.1, 127.3, 127.4, 127.6, 130.7, 131.7, 136.4, 144.5, 182.7, 184.8 ppm
FT-IR (ATR)	ν = 3241, 3206, 3107, 3041, 1808, 1705, 1574, 1406, 1329, 1092 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta	C <sub>28</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> calculado M: 417.1365 Encontrado: [M + H] <sup>+</sup> : 418.1443, [M+Na] <sup>+</sup> : 440.1261

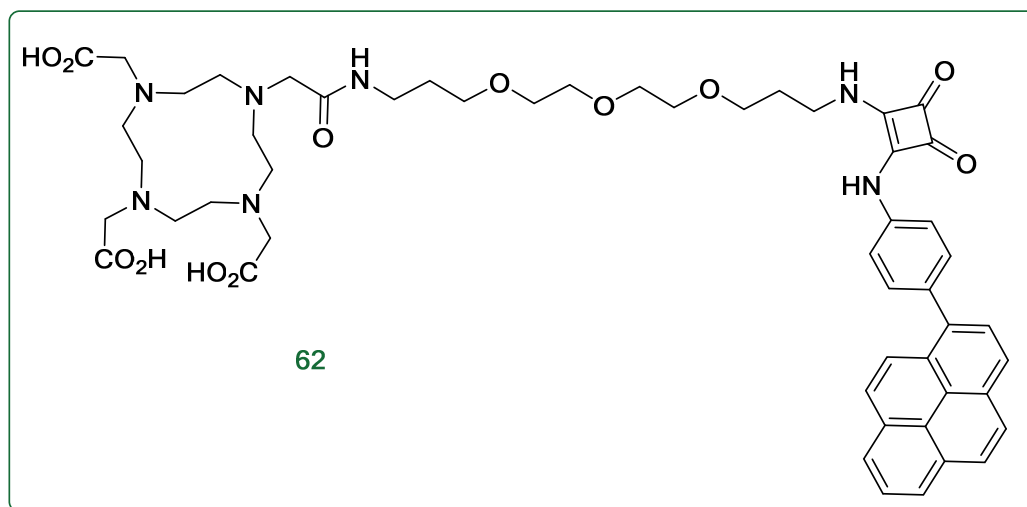
**2,2',2''-(10-(16-((3,4-dioxo-2-((4-(piren-1-il)fenil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azaexadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tri-il)triacetato de tri-*terc*-butilo (48)**



A una mezcla de 311.5 mg (0.746 mmol) de **47**, 27 mg (0.075 mmol) de  $\text{Zn}(\text{OTf})_2$  en 66 mL de tolueno y 3 mL de DMF, se le añade lentamente una mezcla de **46** en 3 mL de tolueno y 1.5 mL de DMF. Se mantiene con agitación a 100 °C durante 12 horas. Se evaporan los disolventes a presión reducida y el crudo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando como eluyente una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$  en gradiente de polaridad (de 95/5/0.5 hasta 9/1/0.1) obteniéndose 300 mg (0.26 mmol) de **48** con un rendimiento del 35%.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ = 1.43 (s, 18H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}_2$ ), 1.45 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}_2$ ), 1.75 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}$ ), 3.47 - 1.90 (m, 29H, ), 3.71 - 3.51 (m, 12H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.87 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 7.32 (s, 1H, NH), 7.55 (d, J = 8.6 Hz, 2H, CH), 8.01 - 7.87 (m, 4H), 8.06 (s, 2H), 8.26 - 8.10 (m, 3H), 9.80 (s, 1H, NH) ppm
<sup>13</sup> C-RMN APT (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ = 27.7, 27.8, 28.7, 29.6, 30, 30.3, 30.8, 37.5, 41.8, 55.5, 55.6, 56, 68.1, 69.6, 69.7, 70.1, 70.3, 70.4, 71.2, 81.7, 81.8, 81.9, 118.7, 122.1, 124.9, 125.5, 125.9, 127.4, 127.6, 128.4, 128.8, 130.3, 130.9, 131.3, 135.1, 137.5, 138.9, 164.3, 169.7, 171.3, 172.4, 172.8, 180.6, 184.3 ppm
FT-IR (ATR)	$\nu$ = 3306, 2974, 2865, 2361, 1791, 1727, 1673, 1619, 1589, 1454, 1369, 1304, 1229, 1160, 1107, 1030, 848 $\text{cm}^{-1}$
Masa Exacta (ESI-TOF+)	$\text{C}_{64}\text{H}_{87}\text{N}_7\text{O}_{12}$ [M] calculado: 1145.6413 Encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 1146.6541

Intento de obtención de ácido 2,2',2''-(10-(16-((3,4-dioxo-2-((4-(piren-1-il)fenil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azahexadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tril)triacetico (62)<sup>194</sup>

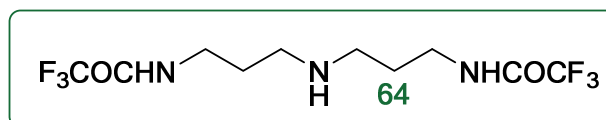


Una mezcla de 227.6 mg (0.19 mmol) de **48** en 934 mg (9.93 mmol) de fenol se calienta a 60°C hasta completa disolución de fenol, posteriormente se le añaden 0.35 mL de HCl 35%. Se mantiene a 60°C durante 4 horas. Se sigue el curso de reacción por TLC y por HPLC-MS y se observa la formación del producto hidrolizado con masa 977.1 Da. Se trata la reacción con Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O para eliminar el fenol, se evapora la fase acuosa obteniéndose 215.2 mg. Se analiza en HPLC-MS el producto evaporado de la fase acuosa pero no se vuelve a observar el ion molecular del producto hidrolizado, en RMN tampoco se observan los picos correspondientes al producto ya que no aparecen las señales aromáticas.

<sup>194</sup> 11. Torii, S.; Tanaka, H.; Taniguchi, M.; Kameyama, Y.; Sasaoka, M.; Shiroy, T.; Kikuchi, R.; Kawahara, I.; Shimabayashi, A.; Nagao, S. Deprotection of Carboxylic Esters of Beta-Lactam Homologs - Cleavage of Para-Methoxybenzyl, Diphenylmethyl, and Tert-Butyl Esters Effected by A Phenolic Matrix. *Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56 (11), 3633-3637.

### 6.6.5. Derivados de bispropilentriamina

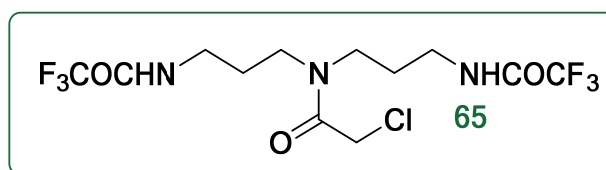
#### *N,N'*-(azandiilbis(propan-3,1-diil))bis(2,2,2-trifluoroacetamida) (64)



A una mezcla de *N'*-(3-aminopropil)propano-1,3-diamina (63) en 15 mL de THF anhidro, se le añade a 0°C, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, durante, 20 minutos, 1 mL (8.38 mmol) de trifluoroacetato de etilo. Se mantiene con agitación durante 10 minutos, tras los cuales se coge una alícuota y se comprueba en RMN el curso de la reacción: se observa todavía la presencia de producto de partida, se añaden otros 0.5 mL (4.19 mmol) de trifluoroacetato de etilo a 0 °C, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Se evapora el disolvente obteniéndose el producto bisprotegido **64** con rendimiento cuantitativo.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 1.35 (s ancho, 1H, CH <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> ), 1.74 (m, 4H, CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH), 2.74 (m, 4 H, CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH), 3.46 (m, 4H, CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH), 8 (s ancho, 1H, CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH) ppm
Masa (FAB)	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> calculado [M•] <sup>+</sup> : 323.1068 encontrado [M + H] <sup>+</sup> : 324.2

#### *N*-(3-(2-cloro-*N*-(3-(2,2,2-trifluoroacetamida)propil)acetamida)propil)-2,2,2-trifluoroacetamida (65)



A una disolución de 351 mg (1.087 mmol) de *N,N'*-(azandiilbis(propan-3,1-diil))bis(2,2,2-trifluoroacetamida) **64** en 6 mL de DCM seco, se le añaden a 0°C, bajo atmósfera de Ar, lentamente 0.454 mL de Et<sub>3</sub>N seca, se deja reaccionar hasta completa disolución. Se añade lentamente una disolución de 95 µL (1.196 mmol) de cloruro de cloroacetilo en 2 mL de

DCM seco. Terminada la adición se eleva la temperatura a 25 °C y se mantiene con agitación durante 12 horas.

Se purifica el crudo por extracción con una disolución acuosa de KHSO<sub>4</sub>/DCM, se seca la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose 267.7 mg (0.67 mmol) de producto acilado **65** con un rendimiento de 62%.

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 1.35 (s ancho, 1H, CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>), 1.74 (m, 4H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2.74 (m, 4 H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.46 (m, 4H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 8 (s ancho, 1H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH) ppm

Masa (FAB) C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>ClF<sub>6</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> calculado [M•]<sup>+</sup>: 399.07  
encontrado [M + H]<sup>+</sup>: 400.08

### Intento de obtención de (azandiilbis(propan-3,1-diil))dicarbamato de di-*terc*-butilo (**69**)

#### Método: dicarbonato de di-*terc*-butilo y DIPEA

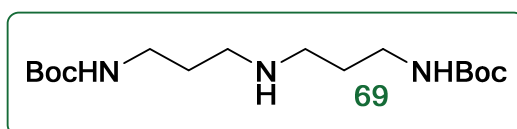
A una mezcla de 1 g (7.2 mmol) de *N*'-(3-aminopropil)propano-1,3-diamina (**63**) en 10 mL de DCM anhidro, se añaden a 0°C, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, 2.87 mL (16.76 mol) de DIPEA anhidra, posteriormente se adiciona lentamente una mezcla de 1831 mg (8.38 mmol) de dicarbonato de di-*terc*-butilo en 5 mL de DCM seco. Se eleva la temperatura a 25°C y se mantiene con agitación durante 12 horas. Se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente de polaridad empleando como eluyente una mezcla de DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (de 95/50.5 hasta 1/1/0.1) obteniéndose el producto bisprotegido con muy bajo rendimiento: 11% 397 mg (1.19 mmol). Se ha encontrado producto trisprotegido con un rendimiento del 19 %, 596.7 mg (1.38 mmol), confirmados por RMN y EM.

**Método: carbonil diimidazol y *tert*-butanol**<sup>205</sup>

Una mezcla de 391 mL (30.48 mmol) de *tert*-butanol, 4942 mg (30.48 mmol) de carbonildiimidazol y 42 mg (0.762 mmol) de KOH en 110 mL de tolueno se mantiene en atmósfera de nitrógeno con agitación a 60°C durante 3 horas. Al cabo de ese tiempo se añaden 2.155 mL (15.24 mmol) de *N*'-(3-aminopropil)propano-1,3-diamina (**63**) y se mantiene 3 horas con agitación a 60°C. Se purifica el crudo por extracción con H<sub>2</sub>O/DCM, se seca la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice en condiciones isocráticas empleando como eluyente una mezcla de DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (98/2/0.2) obteniéndose solamente imidazol.

**Método: *tert*-butanol/H<sub>2</sub>O y NaOH**

A una mezcla de 2.155 mL (15.24 mmol) de *N*'-(3-aminopropil)propano-1,3-diamina (**63**) en 10 mL de *tert*-butanol y 10 mL de H<sub>2</sub>O se le añaden a 0°C 6.66 g (30.48 mmol) de dicarbonato de di-*tert*-butilo en *tert*-butanol y agua (5+5 mL). Se mantiene con agitación durante 3 horas, se evapora el *tert*-butanol a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por extracción, se comprueba por TLC y se observa solo producto triprotegido.

**(Azandiilbis(propan-3,1-diil))dicarbamato de di-*tert*-butilo (**69**)**<sup>228</sup>

A una mezcla de 2 g (15.24 mmol) de *N*'-(3-aminopropil)propan-1,3-diamina (**63**) en 12 mL de DMF seca se le añaden en atmósfera de Ar lentamente 6.512 g (33.528 mmol) de carbonato de fenil *tert*-butilo. Se mantiene con agitación durante 48 horas a 25°C. Se purifica por extracción

<sup>205</sup> Rannard, S. P.; Davis, N. J. The selective reaction of primary amines with carbonyl imidazole containing compounds: Selective amide and carbamate synthesis. *Organic Letters* **2000**, 2(14), 2117-2120.

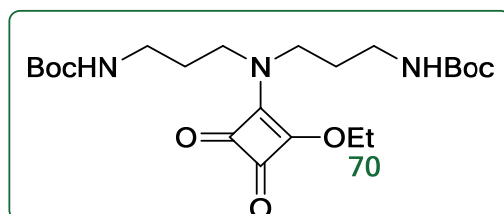
<sup>228</sup> Pittelkow, M.; Lewinsky, R.; Christensen, J. B. Selective synthesis of carbamate protected polyamines using alkyl phenyl carbonates. *Synthesis-Stuttgart* **2002**, (15), 2195-2202.



en tampón fosfato 0.025 M a pH 3 y DCM (100 mL x 3), se eleva el pH a 9 y se extrae con DCM. Se secan las fases orgánicas con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Se seca en alto vacío para eliminar los residuos de DMF. El crudo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente de polaridad empleando como eluyente una mezcla de DCM/MeOH/ $\text{NH}_4\text{OH}$  (de 95/5/0.5 hasta 8/2/0.2). Se obtienen 3517.8 mg (0.61 mmol) de producto bisprotegido **69** con un rendimiento de 69.6%.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ = 1.42 (s, 18H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}_2$ ), 1.64 (p, $J$ = 6.5 Hz, 4H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 1.80 (s, 1H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 2.64 (t, $J$ = 6.5 Hz, 4H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 3.19 (q, $J$ = 5.6 Hz, 4H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 5.20 (s, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ )
<sup>13</sup> C-RMN CPD (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ = 28.4, 37.8, 38.2, 46.8, 79.4, 156.5 ppm
FT-IR (ATR-Ge)	$\nu$ = 3388, 3342, 2932, 2825, 1683, 1534, 1363, 1273, 1186, 1051, 950, 868, 809, 779, 661 $\text{cm}^{-1}$
Masa Exacta (ESI-TOF+)	$\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$ [M] calculado: 331.2471 Encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 332.2555

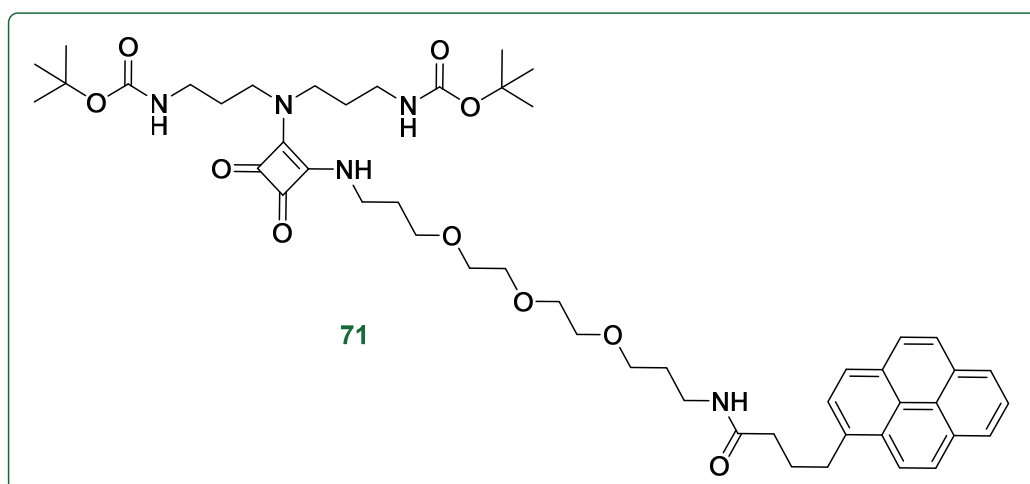
**(((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)azandiil)bis(propan-3,1-diil))dicarbamato de di-*terc*-butilo (**70**)**



A una disolución de 3.318 g (10.01 mmol) de (azandiilbis(propan-3,1-di-il))dicarbamato de di-*terc*-butilo **69** en 20 mL de EtOH se añade lentamente una disolución de 1.77 mL (12.01 mmol) de 3,4-dietoxiciclobut-3-en-1,2-diona en 4 mL de EtOH. Se mantiene con agitación durante 12 horas. Se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente de polaridad empleando como eluyente una mezcla de DCM/MeOH/ $\text{NH}_4\text{OH}$  (de 99/1/0.1 hasta 9/1/0.1). Se obtienen 3427 mg (7.52 mmol) de producto **70** con un rendimiento de 74%.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ = 1.43 (s, 18H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ), 1.47 (t, $J$ = 7.1 Hz, 3H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.87 - 1.76 (m, 4H, NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHBoc), 3.20 - 3.07 (m, 4H, NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHBoc), 3.45 (t, $J$ = 6.8 Hz, 2H, NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHBoc), 3.70 (t, $J$ = 6.8 Hz, 2H, NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHBoc) 4.74 (s, 1H, NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHBoc), 4.78 (q, $J$ = 7.1 Hz, 2H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.64 (t, $J$ = 6.5 Hz, 4H, NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHBoc), 3.19 (q, $J$ = 5.6 Hz, 4H, NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHBoc), 5.07 (s, 2H, NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHBoc) ppm
<sup>13</sup> C-RMN (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ = 15.8, 28.4, 291, 37.2, 37.6, 46.4, 47.1, 69.9, 79.4, 155.8, 156.1, 172, 176.5, 182.1, 189.1 ppm
FT-IR (ATR-Ge)	$\nu$ = 3370, 3355, 2980, 2866, 2956, 2931, 1800, 1684, 1597, 124, 1489, 1458, 1448, 1434, 1364, 1246, 1167, 995, 868, 828 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (ESI-TOF+)	C <sub>22</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> [M] calculado: 455.2632 Encontrado [M+H] <sup>+</sup> : 456.2700, [M+Na]: 478.2529

**(((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)azandiil)bis(propan-3,1-diil))dicarbamato de di-*terc*-butilo (71)**

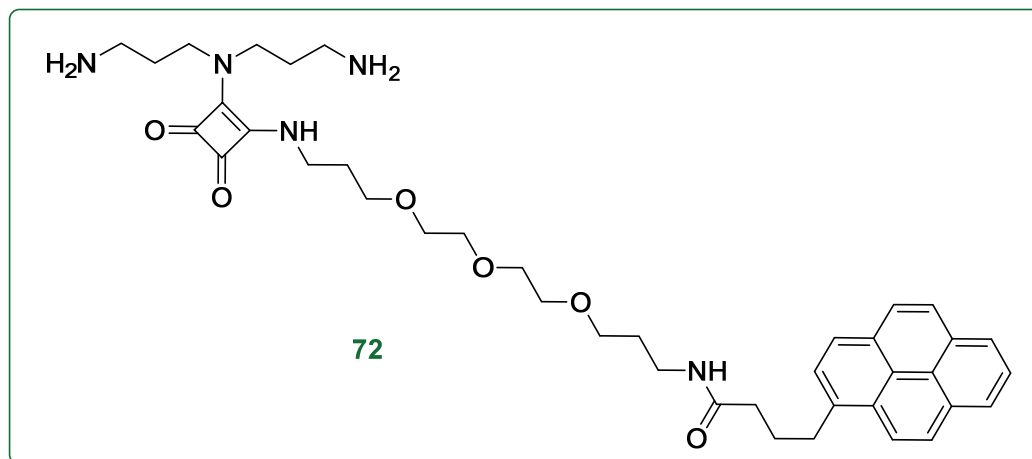


A una disolución de 532 mg (1.17 mmol) de *N*-(3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida **38** en 10 mL de EtOH se le añaden 1.2 mL (7 mmol) de DIPEA anhidra y posteriormente se añade lentamente una disolución de 532 mg (1.17 mmol) de (((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)azandiil)bis(propan-3,1-diil))dicarbamato de di-*terc*-butilo **70** en 5 ML de EtOH. Se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente a presión reducida y se extrae el crudo obtenido con H<sub>2</sub>O y DCM y posteriormente con una disolución acuosa de KHSO<sub>4</sub> a pH 3. Finalmente se seca la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub>, y se evapora el disolvente a presión

reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente de polaridad empleando como eluyente una mezcla de DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (de 98/2/0.2 hasta 94/6/0.6). Se obtienen 568.8 mg (0.63 mmol) de 71 con un rendimiento de 54%.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ = 1.41 (s, 18H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ), 1.78 - 1.66 (m, 6H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHBoc), 1.89 - 1.79 (m, 2H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHBoc), 2.27 - 2.03 (m, 2H, NHCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C), 2.40 (t, $J$ = 7.5 Hz, 2H, NHCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C), 3.08 (t, $J$ = 6.1 Hz, 4H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHBoc), 3.57 - 3.27 (m, 14H, CH <sub>2</sub> O, NHCOOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C), 3.75 (t, $J$ = 5.9 Hz, 2H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHBoc), 5.41 (s, 1H, NH), 6.70 (s, 1H, NH), 6.86 (s, 1H, NH), 7.86 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1H, Ar), 7.99 (t, $J$ = 7.6 Hz, 1H, Ar), 8.02 (s, 2H, Ar), 8.12 - 8.07 (m, 2H, Ar), 8.18 - 8.13 (m, 2H, Ar), 8.29 (d, $J$ = 9.3 Hz, 1H, Ar) ppm
<sup>13</sup> C-RMN (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ = 27.6, 28.4, 28.1, 29.7, 30.9, 32.8, 35.9, 38.2, 42.8, 46.9, 69.2, 69.9, 70.0, 79.4, 123.4, 124.8, 12.9, 125.9, 126.7, 128.7, 129.9, 130.8, 131.3, 135.8, 156.3, 167.4 ppm
FT-IR (ATR-Ge)	$\nu$ = 3304, 2929, 2868, 1790, 1666, 1575, 1512, 1364, 1248, 1164, 845 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (ESI-TOF+)	C <sub>50</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> [M] calculado: 899.5044 Encontrado [M+H] <sup>+</sup> : 900.5135; [M+Na] <sup>+</sup> 922.4953

**N-(3-(2-(2-(3-((2-(bis(3-aminopropil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propoxi)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida (72)**

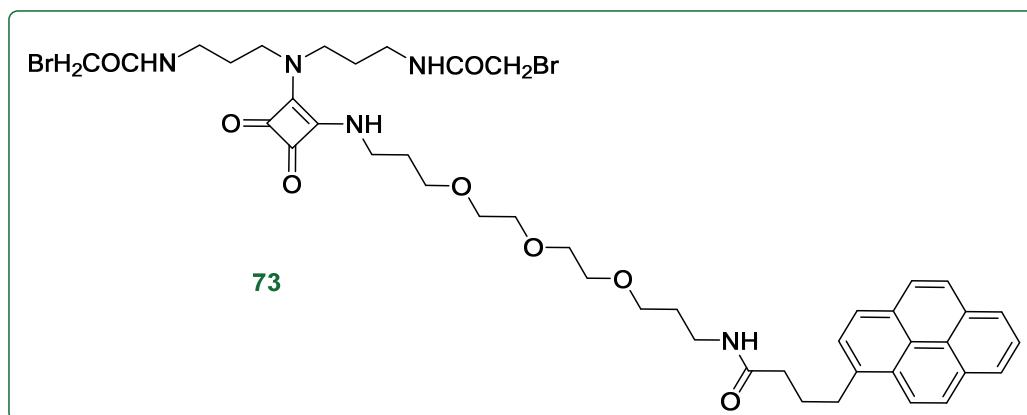


Una disolución de 580 mg (0.64 mmol) de (((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)azandi-il)bis(propan-3,1-diil))di carbamato de *tert*-butilo 71 en 10 mL de DCM seco, se mantiene a 0°C con agitación durante 10 minutos y se le añaden 27 mL (1.29 mmol) de triisopropilsilano y se mantiene con agitación otros 5

minutos. Se prepara una mezcla de 2.05 mL (25.77 mmol) de ácido trifluoroacético en 5 mL de DCM seco y se mantiene a 0°C durante 10 minutos. Se añade esta segunda mezcla a la reacción, se mantiene a 0°C durante 15 minutos y posteriormente se sube la temperatura de reacción a 25°C manteniendo la agitación durante 2 horas. Se sigue el curso de la reacción por HPLC-MS (ESI +). Tras observar el ion molecular del producto hidrolizado y la desaparición del producto protegido con Boc se evapora el disolvente a presión reducida, y se lava con H<sub>2</sub>O y DCM. Se evapora la fase acuosa y se seca en alto vacío, obteniéndose 450 mg (0.64 mmol) de **72** con rendimiento cuantitativo.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	1.72 (q, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH), 1.80 (dq, <i>J</i> = 12.7, 6.3 Hz, 2H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH), 1.96 (p, <i>J</i> = 7.3 Hz, 4H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ), 2.14 (d, <i>J</i> = 4.1 Hz, 2H, NHCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C), 2.33 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H, NHCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C), 3.02 - 2.89 (m, 4H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ), 3.25 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H, CNCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O), 3.40 - 3.32 (m, 2H, NHCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C), 3.54 - 3.40 (m, 12H, CH <sub>2</sub> O), 3.60 (m, 4H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ), 3.70 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H, CNCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O), 7.86 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H, Ar), 8.03 - 7.94 (m, 3H, Ar), 8.10 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H, Ar), 8.16 (dd, <i>J</i> = 7.3, 3.0 Hz, 2H, Ar), 8.30 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H, Ar)
<sup>13</sup> C-RMN CPD (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	δ = 24.2, 28.3, 29.1, 30.4, 32.3, 33.8, 36.8, 37.7, 37.9, 43.4, 47.5, 69.7, 69.8, 71, 71.2, 113.6, 116.5, 119.4, 124.4, 125.8, 125.9, 126.2, 127.0, 127.7, 12.4, 128.5, 129.9, 131.3, 132.3, 132.8, 137.3, 161.9, 162.3, 162.7, 168.5, 169.0, 175.8, 183.3, 183.9 ppm
FT-IR (ATR-Ge)	ν = 3300, 3043, 2951, 2876, 1792, 1669, 1579, 1524, 1438, 1398, 1376, 1342, 1201, 1131, 1028, 978, 845, 799 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (ESI-TOF+)	C <sub>40</sub> H <sub>53</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> [M] calculado: 699.3996 Encontrado [M+H] <sup>+</sup> : 700.4071, [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 682.3947, [M+2H] <sup>2+</sup> /2 350.7094 y [M+2H-H <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup> /2 341.7049

***N,N'*(((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)azanedil)bis(propan-3,1-diil)bis(2-bromoacetamida) (73)**



A una disolución de 450 mg (0.64 mmol) de **72** en 10 mL de ACN seco, se le añaden a 0 °C, bajo atmosfera de Argón 395  $\mu$ L (2.83 mmol) de Et<sub>3</sub>N seca y a continuación, se añade lentamente, una mezcla de 246  $\mu$ L (2.84 mmol) de bromuro de bromoacetilo en 3 mL de ACN seco. Se eleva la temperatura a 25 °C y se mantiene con agitación durante 12 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC, observándose la formación de un nuevo producto. Se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo se extrae con DCM/H<sub>2</sub>O y posteriormente con DMC y una solución acuosa de KHSO<sub>4</sub> a pH 3, se obtienen 308 mg de crudo. Se purifica el crudo por cromatografía en columna sobre gel de SiO<sub>2</sub> en gradiente de polaridad empleando como eluyente una mezcla de DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (de 95/5/0.5 hasta 93/7/0.7) y se obtienen 155 mg (0.16 mmol) de **73** con un rendimiento del 26%.

**<sup>1</sup>H-RMN**

(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

$\delta$ , 1.75 (dt,  $J$  = 23.1, 6.3 Hz, 8H OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH, CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO), 2.11 (p,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C), 2.32 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C), 3.15 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>Br), 3.25 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.53 - 3.36 (m, 12H, CH<sub>2</sub>O), 3.66 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H, CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.80 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 7.83 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, Ar), 7.99 - 7.91 (m, 3H, Ar), 8.06 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H, Ar), 8.13 (dd,  $J$  = 7.6, 2.4 Hz, 2H, Ar), 8.26 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN CPD**

(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

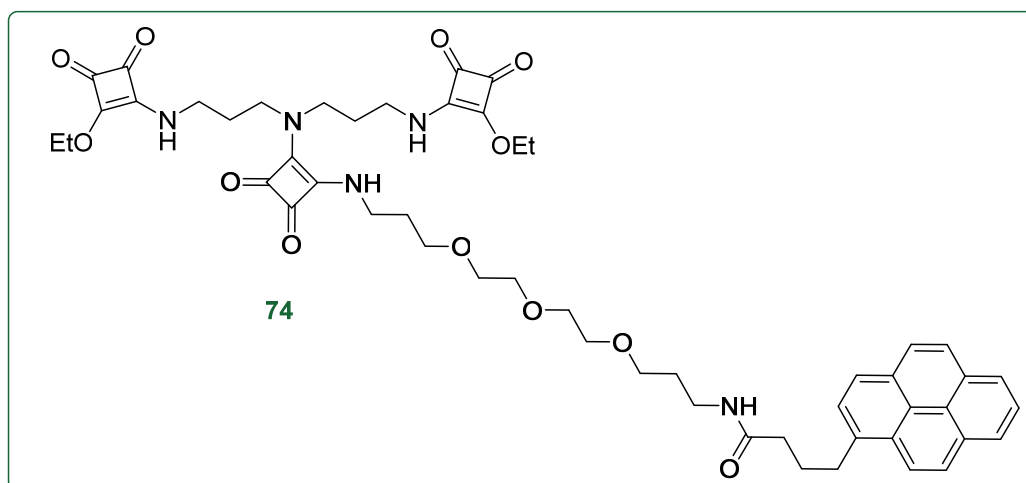
$\delta$  = 29.1, 29.7, 30.4, 33.7, 36.8, 37.9, 43.2, 69.5, 71.1, 71.4, 116, 118.9, 124.4, 125.9, 126.2, 127, 127.7, 128.3, 128.5, 129.9, 131.3, 132.2, 137.3, 158.8, 159.1, 1, 168.7, 168.9, 169.5, 17.7,

183.3, 183.8 ppm  
 Masa  $C_{44}H_{55}Br_2N_5O_8$  [M] calculado: 939.2417  
 (ESI-Simple Cuad) Encontrado  $[M+H]^+$ : 940.4

**Intento de obtención de triacetato de *N,N'*((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)azanedil)bis(propan-3,1-diil)bis(2- tri-*tert*-butil 2,2',2''-(1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil) acetamida)**

En atmósfera de Argón se prepara una mezcla de 187 mg (0.36 mmol) de hidrobromuro de 1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7-tetraazaciclododecano (27), 101 mg (0.73 mmol) de carbonato potásico en 4 mL de ACN seco y se mantiene con agitación durante 10 minutos. Paralelamente se prepara una mezcla de 156 mg (0.165 mmol) de *N,N'*((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)azandiil)bis(propan-3,1-diil)bis(2-bromoacetamida) (73) en 2 mL de ACN seco y para favorecer la solubilidad se añaden 3 mL de DMF seco y se añade a la mezcla de reacción. Se mantiene con agitación durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo y comprobado el curso de la reacción por TLC se observa cómo hay solo productos de partida, se decide mantener con agitación otras 24 horas. No se observa la formación de un nuevo producto, se descarta esta ruta sintética. Por espectroscopia de MS solo se observan los picos de los productos de partida.

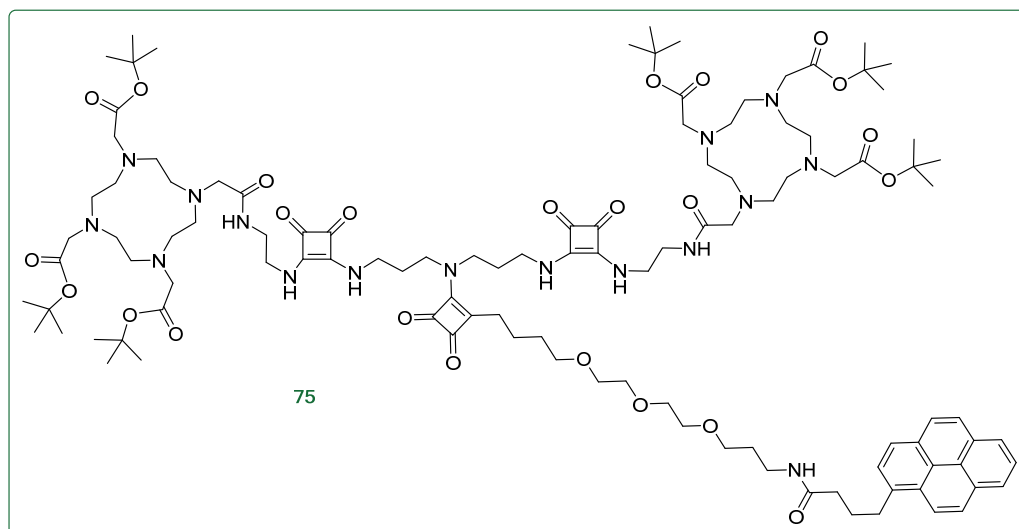
***N*-(3-(2-(2-(3-((2-(bis(3-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propoxi)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida (74)**



A una disolución de 608 mg (0.869 mmol) de **72** en 20 mL de EtOH se le añaden 727  $\mu$ L (5.21 mmol) de Et<sub>3</sub>N seca. Posteriormente se añade una mezcla de 0.3 mL (1.91 mmol) de 3,4-dietoxiciclobut-3-en-1,2-diona en 5 mL de EtOH. Se mantiene con agitación a 0°C durante 15 minutos y al cabo de este tiempo se eleva la temperatura a 25°C manteniendo la agitación durante 24 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto por cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente de polaridad (de 95/5/0.5 hasta 0/10/0 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH) obteniéndose 168.2 mg (0.18 mmol) de **74** con un rendimiento del 20%.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ , 1.36 (t, $J$ = 7.0 Hz, 6H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.74 - 1.65 (m, 4H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH), 2.14 (p, $J$ = 7.7 Hz, 2H, HCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C), 2.34 (t, $J$ = 7.0 Hz, 2H, NHCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C), 3.15 (t, $J$ = 6.9 Hz, 4H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHCO), 3.25 (t, $J$ = 6.8 Hz, 2H, CNCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O), 3.31 (m, 4H, CNCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHCO), 3.53 - 3.36 (m, 12H, CH <sub>2</sub> O), 3.71 (t, $J$ = 6.5 Hz, 2H, CNCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O), 4.63 (q, $J$ = 7.0 Hz, 4H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) 6.88 (s, 1H, NH), 7.10 (s, 1H, Ar), 7.57 (s, 1H, Ar), 7.81 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1H, Ar), 7.99 - 7.91 (m, 3H, Ar), 8.07-8.02 (m, 2H, Ar), 8.12 (d, $J$ = 7.7 Hz, 2H, Ar), 8.23 (d, $J$ = 9.3 Hz, 1H, Ar) ppm
<sup>13</sup> C-RMN CPD (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ = 15.7, 22.6, 27.5, 28.5, 29.2, 29.6, 30.9, 31.8, 32.7, 35.9, 37.8, 41.3, 42.6, 46.2, 50.6, 68.7, 69.6, 69.7, 69.9, 13.2, 124.7, 124.8, 125.8, 126.6, 127.2, 127.3, 128.5, 129.7, 130.6, 131.2, 135.7, 166.9, 167.4, 172.5, 173.7, 177, 177.8, 181.5, 182.8, 189.1 ppm
FT-IR (ATR-Ge)	3266, 2931, 2872, 1802, 1704, 1663, 1604, 1580, 1521, 1455, 1436, 1384, 1348, 1252, 1093, 1051, 909, 847, 729, 646 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (ESI-TOF +)	C <sub>52</sub> H <sub>61</sub> N <sub>5</sub> O <sub>12</sub> [M] calculado: 939.2417 Encontrado [M+H] <sup>+</sup> : 948.4394, [M+Na] <sup>+</sup> 970.4198

## Intento de obtención de bispropilentriamina di DOTA (75)



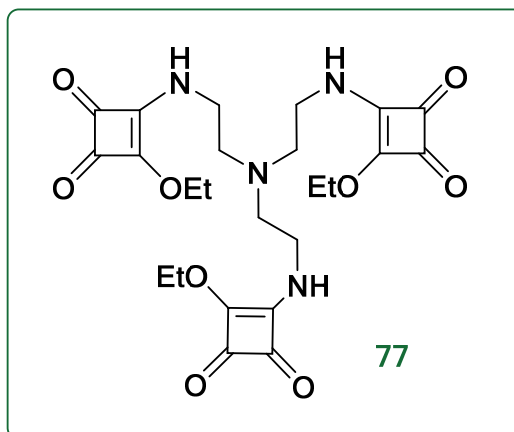
A una disolución de 250 mg (0.40 mmol) de **74** en 10 mL de EtOH se le añaden a 0°C 153  $\mu$ L (1.09 mmol) de Et<sub>3</sub>N seca, posteriormente una mezcla de 173 mg (0.183 mmol) de *N*-(3-(2-(2-(3-((2-(bis(3-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propoxi)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida **11** en 5 mL de EtOH y se mantiene con agitación a 0°C durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo se eleva la temperatura a 25°C y se mantiene con agitación durante 24 horas. Se añaden otros 500 mg de (4-[(2-aminoetilcarbamoil)metil]-7,10-bis-(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-il)-2-acetato de *tert*-butilo **25**. Se sigue el curso de la reacción por TLC y se evapora el disolvente a presión reducida. Se extrae el crudo con H<sub>2</sub>O y DCM y posteriormente se lava la fase orgánica con una disolución acuosa de KHSO<sub>4</sub> a pH 3. En HPLC-MS se observa un pico 1043 Da correspondiente a (M+H)<sup>+</sup>/2. Se purifica el producto por Sephadex LH-20, pero no se consigue la separación del producto. Se decide purificar por cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente de polaridad (de 9/1/0.1 hasta 0/10/0 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH) obteniéndose 21 mg (0.01 mmol) de **75** con un rendimiento de tan solo 5%.



<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	<p>δ=1.45 (s, 54H, COOtBu), 1.86-1.71 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2.02 - 1.86 (m, 8H, HCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C), 2.23-2.13 (m, 2H, NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C), 3.27-2.47 (m, 30H, CH<sub>2</sub> macrociclo, CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO), 3.43 - 3.28 (m, 16H, NCH<sub>2</sub>CO) 3.60 - 3.44 (m, 12H, CH<sub>2</sub>O), 3.71 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H, CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.63 (q, <i>J</i> = 7.0 Hz, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 6.88 (s, 1H, NH), 7.10 (s, 1H, Ar), 7.57 (s, 1H, Ar), 7.81 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H, Ar), 7.99 - 7.91 (m, 3H, Ar), 8.07-8.02 (m, 2H, Ar), 8.12 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H, Ar), 8.23 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H, Ar) δ 8.02 (dd, <i>J</i> = 18.7, 4.5 Hz, 4H), 8.23 - 8.09 (m, 6H) 8.34 (dd, <i>J</i> = 9.0, 5.3 Hz, 2H) ppm</p>
<sup>13</sup> C-RMN CPD (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	<p>δ = 15.7, 22.6, 27.5, 28.5, 29.2, 29.6, 30.9, 31.8, 32.7, 35.9, 37.8, 41.3, 42.6, 46.2, 50.6, 68.7, 69.6, 69.7, 69.9, 13.2, 124.7, 124.8, 125.8, 126.6, 127.2, 127.3, 128.5, 129.7, 130.6, 131.2, 135.7, 166.9, 167.4, 172.5, 173.7, 177, 177.8, 181.5, 182.8, 189.1 ppm</p>
FT-IR (ATR-Ge)	<p>3266, 2931, 2872, 1802, 1704, 1663, 1604, 1580, 1521, 1455, 1436, 1384, 1348, 1252, 1093, 1051, 909, 847, 729, 646 cm<sup>-1</sup></p>
Masa (ESI-Simple Quad +)	<p>C<sub>109</sub>H<sub>66</sub>N<sub>16</sub>O<sub>24</sub> [M] calculado: 2083.2661 Encontrado [M+2H]<sup>2+</sup>/2, 1043.3</p>

### 6.6.6. Derivados de Tren

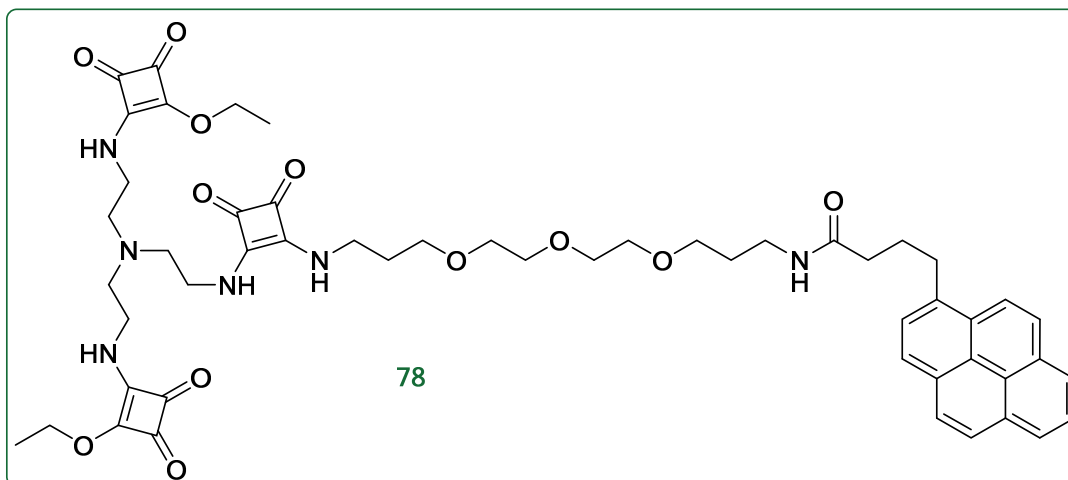
#### 4,4',4''-(((nitritotris(etan-2,1-diil))tris(azadiil))tris(3-etoxiciclobut-3-eno-1,2-diona) (77)



A una disolución de 5 mL (33.79 mmol) de 3,4-dietoxiciclobut-3-en-1,2-diona en 25 mL de EtOH a 0°C se le añade lentamente una mezcla de 506  $\mu$ L (3.379 mmol) de *N,N'*-bis(2-aminoetil)etan-1,2-diamina (76) en 10 mL de EtOH, se mantiene con agitación a 0°C durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo se eleva la temperatura a 25°C y se mantiene con agitación durante 24 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto por cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente de polaridad (de 95/5/0.5 hasta 0/10/0 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH) obteniéndose 1.286 g (2.48 mmol) de 77 con un rendimiento del 73%.

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ = 1.38 (t, $J$ = 7.1 Hz, 9H, CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ), 2.69 (s ancho, 6H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH), 3.50 (s ancho, 6H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH), 4.67 (c, $J$ = 7.1 Hz, 6H, CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ), 7.55 (s, 1H, NH), 7.79 (s, 2H, NH) ppm
<sup>13</sup> C-RMN (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ = 15.6, 41.9, 53.8, 54.5, 55.5, 69.3, 69.6, 69.9, 76.6, 171.7, 171.9, 172.4, 177.3, 177.6, 178.1, 181.8, 182.2, 183.0, 189.1, 190.4, 191. Ppm
FT-IR (ATR)	$\nu$ = 3306, 2974, 2865, 2361, 1791, 1727, 1673, 1619, 1589, 1454, 1369, 1304, 1229, 1160, 1107, 1030, 848 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (ESI-TOF +)	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> [M•] calculado: 518.2013 Encontrado [M+H] <sup>+</sup> : 519.2097, [M+Na] <sup>+</sup> : 541.1881

***N*-(3-(2-(2-(3-((2-((2-(bis(2-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)etil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propoxi)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida (78)**



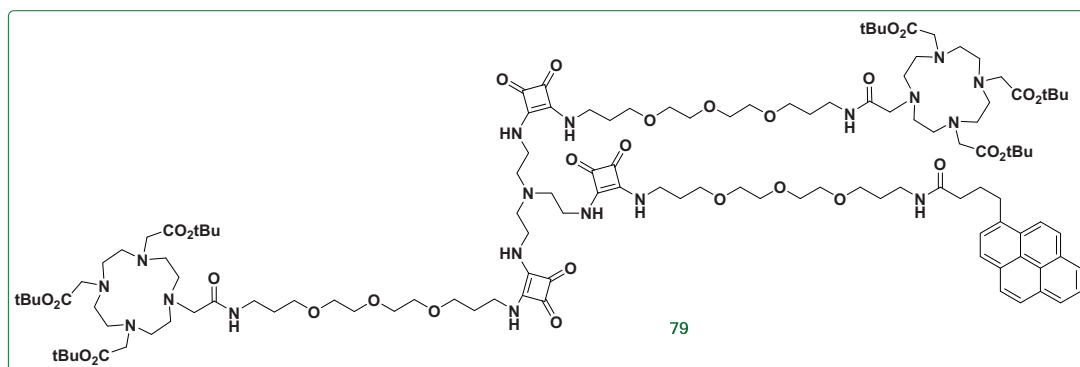
A una disolución de 1.286 g (2.48 mmol) de 4,4',4''-((nitrilotris(etan-2,1-diil))tris(azadiil))tris(3-etoxiciclobut-3-eno-1,2-diona) (77) en 30 mL de EtOH se le añade lentamente a 0°C una mezcla de 1.345 mL (7.1 mmol) de Et<sub>3</sub>N, 405 mg (0.826 mmol) de *N*-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)etoxi)etoxi)propil)-4-(piren-1-il)butanamida (38) en 5 mL de EtOH, se mantiene con agitación a 0°C durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se eleva la temperatura a 25°C y se mantiene con agitación durante 24 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC y por HPLC-MS; se evapora el disolvente a presión reducida. Se trata el crudo de reacción con H<sub>2</sub>O y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y posteriormente con una disolución acuosa de KHSO<sub>4</sub> a pH=3 y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se evapora el disolvente a presión reducida y se purifica el producto por cromatografía por exclusión molecular en columna sobre Sephadex LH20 en condiciones isocráticas (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 7/3) obteniéndose 430 mg (0.44 mmol) de 78 con un rendimiento del 18 %.

<sup>1</sup>H-RMN  
(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ = 1.35 (dt, *J* = 11.2, 6.5 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 1.93-1.70(m, 6H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CON), 2.16 - 2.06 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CON), 2.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.30 (m, 4H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CON, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.47 - 3.35 (m, 12H, CH<sub>2</sub>O), 3.71 - 3.55 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 4.69 - 4.49 (m, 4, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 6.62 (s, 1H, NH), 7.85 - 7.74 (m, 1H), 8.01 - 7.89 (m, 4H, CHAr), 8.04 (dd, *J* = 8.3, 4.0 Hz, 2H CHAr), 8.14 - 8.07 (m, 2H CHAr), 8.23 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, CHAr) ppm

<sup>13</sup> C-RMN (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 15.8, 27.6, 27.8, 28.9, 32.8, 36.1, 37.7, 68.0, 69.7, 70.2, 123.4, 124.8, 125.9, 126.6, 127.3, 128.6, 128.8, 129.8, 130.8, 131.3, 136.0, 173.2, 182.6. ppm
FT-IR (ATR)	ν = 3255, 3042, 2931, 2867, 1800, 1704, 1666, 1585, 1530, 1484, 1344, 1092, 846 cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (Maldi TOF) +	C <sub>52</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>12</sub> calculado [M]: 962.4426a, encontrado[M+Na] <sup>+</sup> : 985.4311

### DiDOTAmonoPegPirenoTREN (79)

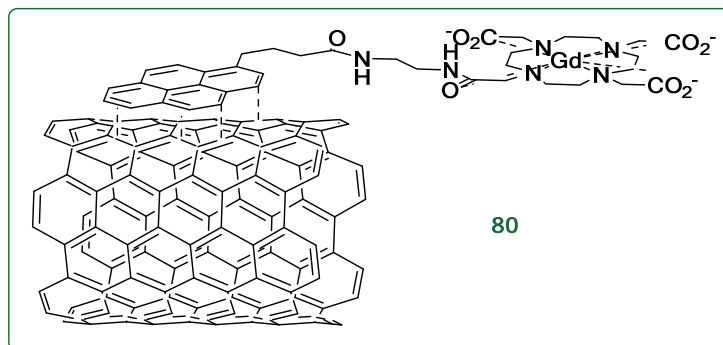


A una disolución de 150 mg (0.156 mmol) de **78** en 25 mL de EtOH se le añade lentamente a 0°C una mezcla de 0.1 mL (0.467 mmol) de Et<sub>3</sub>N, 362 mg (0.467 mmol) de 2,2',2''-(10-(16-amino-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azaexadecil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de tri-*terc*-butilo (**47**) en 10 mL de EtOH, se mantiene con agitación a 0°C durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se eleva la temperatura a 25°C y se mantiene con agitación durante 24 horas. Se sigue el curso de la reacción por TLC y por HPLC-MS y se evapora el disolvente a presión reducida. Se purifica el producto por cromatografía por exclusión molecular en columna sobre Sephadex LH20 en condiciones isocráticas (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 1/1) obteniéndose 375 mg (0.155 mmol) de **79** con un rendimiento de 37 %

<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	$\delta$ = 1.48 - 1.35 (m, 54H), 1.88 - 1.66 (m, 16H), 1.97 - 1.88 (m, 3H), 3.15 - 2.02 (m, 34H), 3.22 (t, $J$ = 6.7 Hz, 4H), 3.28 (d, $J$ = 6.8 Hz, 4H), 3.34 (s, 5H), 3.54 - 3.41 (m, 23H), 3.56 (d, $J$ = 5.2 Hz, 9H), 7.89 (d, $J$ = 7.9 Hz, 1H), 8.04 - 7.94 (m, 3H), 8.12 (d, $J$ = 7.9 Hz, 2H), 8.20 - 8.14 (m, 2H), 8.33 (d, $J$ = 9.3 Hz, 1H) ppm
<sup>13</sup> C-RMN (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	$\delta$ = 15.6, 41.9, 53.8, 54.5, 55.5, 69.3, 69.6, 69.9, 76.6, 171.7, 171.9, 172.4, 177.3, 177.6, 178.1, 181.8, 182.2, 183.0, 189.1, 190.4, 191. Ppm
FT-IR (ATR)	$\nu$ = 3490, 3276, 2970, 2934, 2825, 1793, 1728, 1665, 1591, 1527, 1451, 1433, 1392, 1381, 1326, 1266, 115, 1118, cm <sup>-1</sup>
Masa Exacta (MALDI Tof)	C <sub>124</sub> H <sub>198</sub> N <sub>18</sub> O <sub>30</sub> [M+H] <sup>+</sup> : 2419.5, [M+2H/2] <sup>2+</sup> 1210.72, [M+3H/3] <sup>3+</sup> 807.50 y [M+4H/4] <sup>4+</sup> 605.88

## 6.7. FORMACIÓN DE ADUCTOS POR interacciones $\pi$ - $\pi$ ENTRE MWCNTs COMPLEJOS DE LA (III) Y Gd(III)

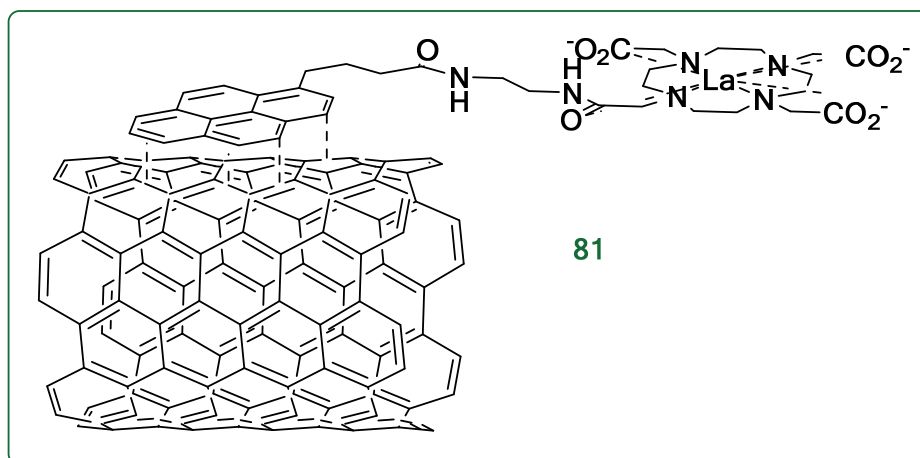
Aducto  $\pi$ - $\pi$  MWCNTsCOOH Gd(III)DOTAmaEtilendiaminaPireno (80)



Una suspensión de 45 mg de MWNTsCOOH, 155 mg de 2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de Gd (III) (21) en 50 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q se sonica con sonicador de punta con una potencia de salida de 10 W durante 4 horas. La reacción se presenta transparente. Se purifica por diálisis para eliminar el complejo de Gd en exceso empleando Membranas Spetra/Por<sup>®</sup> (MWCO 3500 Da) en H<sub>2</sub>O Milli-Q por sucesivos ciclos, (24 horas cada ciclo a una temperatura de 10 °C). Se comprueba el curso de la diálisis analizando las aguas por HPLC-MS. Se evapora el dializado a presión reducida obteniendo 60.3 mg de aducto 80.

TGA (Argon)	100-118 °C (1.7%), 118-300°C (3.8%), 300-550 °C (15.2%)
TGA (aire sintético)	MWCNTs, 550-900°C (15.2%), residuo 69.1%
	100-354°C (17.9%) CO <sub>2</sub> , 354-428°C (21.3%), 428-580°C (49.8%)
	MWCNTs, residuo 10.2%
TXRF	Fe 0.02 %; Gd 1.74 %, Ni 0.003%
FT-IR	$\nu$ = 3282, 2874, 2826, 1715, 1648, 1578, 1553, 1540, 1430,
(ATR-Ge)	1154, 1080 cm <sup>-1</sup>

### Aducto $\pi$ - $\pi$ MWCNTs-fragmentados La(III) DOTAetilendiaminaPireno (81)

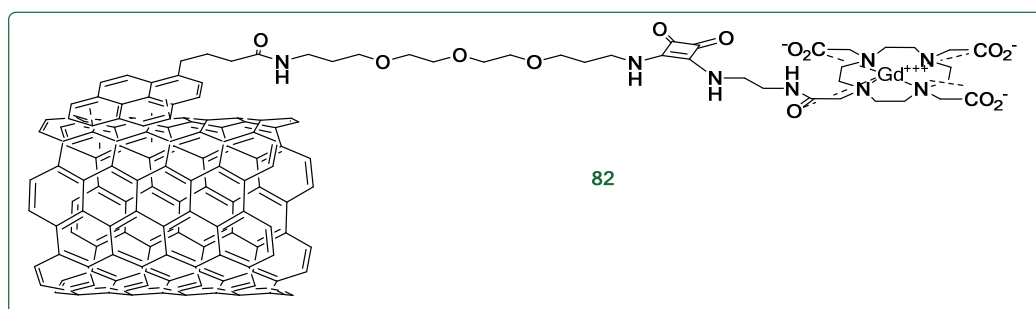


A una disolución de 30 mg de 2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(4-(piren-1-il)butanamido)etil)amino)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de La (III) **33** en 44 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q a pH 6.23 se le añaden 16 mg de MWCNTs fragmentados por ultrasonido. Se sonica con sonicador de punta con una potencia de salida de 10 W durante 3 horas. Se purifica por diálisis para eliminar el complejo de La en exceso empleando Membranas Spetra/Por<sup>®</sup> (MWCO 3500 Da) en H<sub>2</sub>O Milli-Q por sucesivos ciclos, (24 horas cada ciclo a una temperatura de 10 °C). Se comprueba el curso de la diálisis analizando las aguas por HPLC-MS.

TXRF

Fe 0.22%, Co 0.46%, Ni 0.03 %, La 1.46%

### Aducto $\pi$ - $\pi$ MWCNTs-US Gd(III)DOTAPegPireno (82)



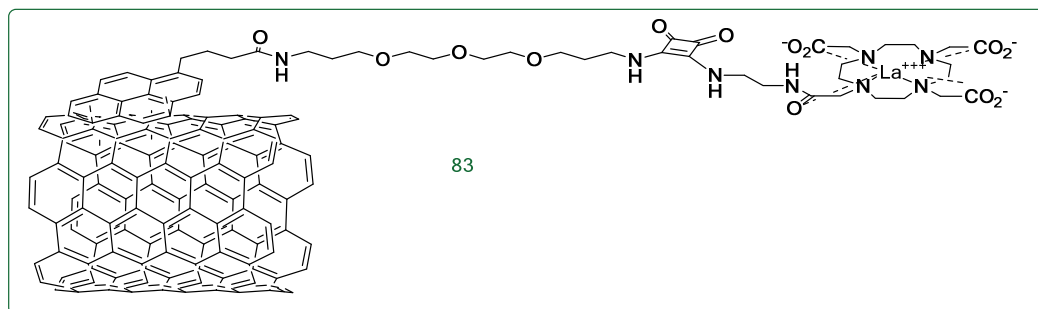
Una suspensión de 40 mg de MWNTs-US fragmentados, 100 mg de 2,2',2''-(10-(2-((2-((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaooctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-

tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de Gadolinio (III) (22b) en 30 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q se sonica con sonicador de punta con una potencia de salida de 10 W durante 3 horas. La reacción se presenta transparente. Se purifica por diálisis para eliminar el complejo de Gd en exceso empleando membranas Spetra Por<sup>®</sup> (MWCO 3500 Da) en H<sub>2</sub>O Milli-Q por sucesivos ciclos, (24 horas cada ciclo a una temperatura de 10 °C). Se comprueba el curso de la diálisis analizando las aguas por HPLC-MS. Se evapora el dializado a presión reducida obteniendo 55 mg de aducto **82**.

TGA (Argon)	150-275°C (4%), 275-500 °C (39.3%), 500-900°C (26.7%), residuo 36.5%
TXRF	Gd 7.53 %, Fe 0.02%, Co 0.05%, Ni 0.01
FT-IR (ATR-Ge)	$\nu = 3313, 3214, 2925, 2850, 1729, 1592, 1534, 1430, 1080 \text{ cm}^{-1}$



### Aducto $\pi$ - $\pi$ MWCNTs-US La(III)DOTAPegPireno (83)



A una disolución de 20.3 mg de 2,2',2''-(10-(2-((2-((3,4-dioxo-2-((15-oxo-18-(piren-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecil)amino)ciclobut-1-en-1-il)amino)etil)amino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triil)triacetato de La (III) (45) en 20 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q a pH 6.69 se le añaden 10 mg de MWCNTs fragmentados por ultrasonido. Se sonica con sonicador de punta con una potencia de salida de 10 W durante 3 horas. Se purifica por diálisis para eliminar el complejo de La en exceso empleando Membranas Spetra Pore<sup>®</sup> (MWCO 3500 Da) en H<sub>2</sub>O Milli-Q por sucesivos ciclos, (24 horas cada ciclo a una temperatura de 10 °C). Se comprueba el curso de la diálisis analizando las aguas por HPLC-MS.

TXRF

Fe 0.0169 %; Co 0.0371 %; Ni 0.0071; La 1.8798 %

## 6.8. CARACTERIZACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO Y ADUCTOS

### 6.8.1. Análisis termogravimétrico

Atmósfera de argón: 30 minutos en isoterma a temperatura ambiente y rampas de 10°C/min hasta 1000°C. Flujo de 90 mL/min.

Atmósfera de nitrógeno: rampa de calefacción 50 °C/min, de 20-900 °C. Flujo de 90 mL/min. Atmósfera de aire sintético: rampa de calefacción 50 °C/min, de 20-900 °C. Flujo de 90 mL/min. En algunos casos se han realizado estudios de TGA acoplado a masa (MS), para estudiar las especies perdidas durante el calentamiento de las muestras en un rango de 15 a 50 Da. En estos estudios se ha empleado una atmósfera de Argón, 30 minutos en isoterma a temperatura ambiente y rampas de 2 °C/min hasta 1000°C. Flujo de 90 mL/min.

### 6.8.2. Dispositivo superconductor de interferencia cuántica

Para medir los ciclos de histéresis se emplean diferentes muestras de SWCNTs comerciales y oxidados durante 24 y 48 horas disueltos en suero fetal bovino (FBS) y ultrasonificados durante 15 minutos. Las muestras se colocan dentro del magnetómetro SQUID en estado líquido. Se aplica un campo magnético de 5T para orientar las muestras y se congela para mantener la orientación. Se miden los ciclos de histéresis a 5K en dos direcciones, paralela y perpendicular al campo magnético externo.

### 6.8.3. Experimentos de Imagen por Resonancia Magnética

Los experimentos de MRI se realizan en un espectrómetro Bruker Pharmascan 7 Tesla (Bruker Daltonics, Ettlingen, DE), empleando una bobina de 38 mm. Los resultados de Imagen por Resonancia Magnética se han analizado pixel por pixel con un programa desarrollado en nuestro grupo de investigación MyMap Analyzer basado en MatLab (MathWorks, Natick, Massachusetts, US) para obtener los correspondientes mapas de ADC,  $T_1$  y  $T_2$ .

### 6.8.3.1. MWCNTs

Se realizan experimentos de difusión de MWCNTs y agua: adquiridos con una secuencia DTI Epi; TE 27 ms, TR 3000 ms; ancho del corte 1 mm; 3 direcciones; 7 valores de B (50; 100; 150; 200; 250; 300; 400 s/mm<sup>2</sup>).

Mapas de T<sub>1</sub> de los complejos de Gd, La; aductos de MWCNTs; y agua: se emplea una secuencia RAREVTR (TE 12.621 ms; con 7 valores de TR: 6000, 3500, 1600, 900, 400, 200, 150 ms, F.O.V 21X21 mm).

Mapas de T<sub>2</sub> de los complejos de Gd, La; aductos de MWCNTs; agua: se emplea una secuencia Multi Spin Multi Eco (TE 12 ms; TR: 5000).

### 6.8.4. Citotoxicidad

#### 6.8.4.1. SWCNTsCOOH.

Se investiga la toxicidad celular con dos ensayos diferentes: estudiando la valoración de la actividad mitocondrial con el ensayo MTT o valorando la integridad de la membrana plasmática (ensayo LDH), respectivamente. Las células C6 se crecen hasta confluir en DMEM. Se añaden a cada pocillo de una placa de 96 alícuotas en suero fetal bovino (FBS, Gibco, Life Technologies, Alcobendas, Madrid, ES) de SWCNTs oxidados con ácido nítrico durante 24 horas para obtener concentraciones finales en el rango de 1-1000 µg.mL<sup>-1</sup>, cada concentración por triplicado. La actividad de la LDH se determina espectrofotométricamente (340 nm, Spectramax , Molecular Devices , Downington, PA, US) tras la disminución lineal de la absorbancia del NADH en mezclas que contienen HEPES (50 mM) a pH = 7.0 , piruvato (5 mM) y NADH (0.6 mM). Se inicia la reacción con la adición de las alícuotas de medio de incubación o del lisado celular obtenido después de cuatro ciclos de congelación y descongelación. Como blancos se emplean alícuotas de medio de incubación que no contiene SWCNTs y como máximo de liberación de LDH, la inducida por la adición del detergente dodecilsulfato de sodio (2%) a las suspensiones celulares. De ahí se determina la LDH liberada fraccional (medio LDH/(LDH del medio + LDH del lisado celular) ya sea después de 1h o 24h de incubación.

La viabilidad celular se determina espectrofotométricamente (570 nm, Spectramax, Molecular Devices, Downington, PA, US) después de 1 y 24

horas de incubación a 37.5 °C en atmosfera de CO<sub>2</sub> (6%) de diferentes suspensiones de SWCNTsCOOH (24 horas) empleando el kit comercial para la determinación de la actividad mitocondrial a través de la reducción de la sal de tetrazolio bromuro (MTT, Millipore, Billerica, MA, US). Como blanco se emplean las células incubadas en medio en ausencia de SWNCTsCOOH, mientras que la muerte celular se induce añadiendo hidrazina (5mM) al medio de incubación.

#### **6.8.5. Experimentos de fluorescencia**

Se han realizado tanto los espectros de absorción como de emisión de fluorescencia de diferentes aductos de MWCNTs y también se han realizado estudios magneto-ópticos de dispersión de la luz y de la anisotropía de los sistemas en presencia y ausencia de un campo magnético local.



## Anexo I: Publicaciones

---



## Research Paper

# Magnetoliposomes Loaded with Poly-Unsaturated Fatty Acids as Novel Theranostic Anti-Inflammatory Formulations

Daniel Calle<sup>1</sup>, Viviana Negri<sup>1,2</sup>, Paloma Ballesteros<sup>2</sup> and Sebastián Cerdán<sup>1</sup>✉

1. Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC/UAM, c/ Arturo Duperier 4, Madrid 28029, Spain.
2. Laboratorio de Síntesis Orgánica e Imagen Molecular por Resonancia Magnética, Facultad de Ciencias, UNED, Unidad Asociada al CSIC, c/ Paseo Senda del Rey 9, Madrid 28040, Spain.

✉ Corresponding author: Prof. Sebastian Cerdan, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC/UAM c/ Arturo Duperier 4, Madrid 28029, Spain. Phone: 0034-91-585-4444 Fax: 0034-91-585-4401 Email: scerdan@iib.uam.es.

© 2015 Ivyspring International Publisher. Reproduction is permitted for personal, noncommercial use, provided that the article is in whole, unmodified, and properly cited. Please see <http://ivyspring.com/terms> for terms and conditions.

Received: 2014.07.09; Accepted: 2014.12.18; Published: 2015.02.15

## Abstract

We describe the preparation, physico-chemical characterization and anti-inflammatory properties of liposomes containing the superparamagnetic nanoparticle Nanotex, the fluorescent dye Rhodamine-100 and omega-3 polyunsaturated fatty acid ethyl ester ( $\omega$ -3 PUFA-EE), as theranostic anti-inflammatory agents. Liposomes were prepared after drying chloroform suspensions of egg phosphatidylcholine, hydration of the lipid film with aqueous phases containing or not Nanotex, Rhodamine-100 dye or  $\omega$ -3 PUFA-EE, and eleven extrusion steps through nanometric membrane filters. This resulted in uniform preparations of liposomes of approximately 200 nm diameter. Extraliposomal contents were removed from the preparation by gel filtration chromatography. High Resolution Magic Angle Spinning <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy of the liposomal preparations containing  $\omega$ -3 PUFA-EE revealed well resolved <sup>1</sup>H resonances from highly mobile  $\omega$ -3 PUFA-EE, suggesting the formation of very small (ca. 10 nm)  $\omega$ -3 PUFA-EE nanoguticles, tumbling fast in the NMR timescale. Chloroform extraction of the liposomal preparations revealed additionally the incorporation of  $\omega$ -3 PUFA-EE within the membrane domain. Water diffusion weighted spectra, indicated that the guticles of  $\omega$ -3 PUFA-EE or its insertion in the membrane did not affect the average translational diffusion coefficient of water, suggesting an intraliposomal localization, that was confirmed by ultrafiltration. The therapeutic efficacy of these preparations was tested in two different models of inflammatory disease as inflammatory colitis or the inflammatory component associated to glioma development. Results indicate that the magnetoliposomes loaded with  $\omega$ -3 PUFA-EE allowed MRI visualization in vivo and improved the outcome of inflammatory disease in both animal models, decreasing significantly colonic inflammation and delaying, or even reversing, glioma development. Together, our results indicate that magnetoliposomes loaded with  $\omega$ -3 PUFA-EE may become useful anti-inflammatory agents for image guided drug delivery.

Key words: Magnetoliposomes,  $\omega$ -3 poly-unsaturated fatty acid ethyl ester, Superparamagnetic nanoparticle, MRI, Image guided drug delivery.

## Introduction

Inflammatory lesions are associated to the most prevalent and morbid pathologies in developed countries including atherosclerosis [1, 2], neuro-

degeneration [3, 4] diabetes or obesity [5, 6] and cancer [7-9], among others. Decreases in the inflammatory phenotype are known to reduce disease progres-



## CONCISE ARTICLE

[View Article Online](#)  
[View Journal](#) | [View Issue](#)

## Single-walled carbon nanotubes as anisotropic relaxation probes for magnetic resonance imaging†

Cite this: *Med. Chem. Commun.*, 2013, **4**, 669Arisbel Cerpa,<sup>a</sup> Mariana Köber,<sup>b</sup> Daniel Calle,<sup>c</sup> Viviana Negri,<sup>d</sup> Jose María Gavira,<sup>e</sup> Antonio Hernanz,<sup>e</sup> Fernando Briones,<sup>b</sup> Sebastián Cerdán<sup>c</sup> and Paloma Ballesteros<sup>\*d</sup>Received 9th August 2012  
Accepted 4th February 2013

DOI: 10.1039/c3md20235f

[www.rsc.org/medchemcomm](http://www.rsc.org/medchemcomm)

We report on the preparation and characterization of magnetically oriented single-walled carbon nanotube arrangements as novel nanoprobe to enhance anisotropically water relaxation as detected by magnetic resonance imaging methods. SWCNT suspensions immobilized in agarose gels showed evident magnetic anisotropy with significantly longer  $T_2$  in the parallel than in the perpendicular orientations.

Magnetic Resonance Imaging (MRI) has become one of the most powerful tools in modern medical diagnosis because of its non-invasive character, high inherent spatial resolution and the possibility to enhance locally and specifically image intensity using appropriate paramagnetic or superparamagnetic contrast agents (CAs). Most of the MRI CAs currently available are chelates of paramagnetic metals of the rare earth series or superparamagnetic iron oxide nanoparticles, the Gd(III) chelates being the most widely used.<sup>1</sup> In all these cases, the induced relaxation of the water molecules surrounding the probe is isotropic precluding the encoding of directionality in many fundamental biological processes already detectable by molecular imaging.<sup>2,3</sup>

On these grounds, it would entail considerable relevance to develop CAs in which the predominant molecular orientation of the probe with respect to the external magnetic field can be inferred from the non-invasive MRI measurement. We have previously shown that SWCNT suspensions are excellent candidates for this purpose, since they orient parallel to the external magnetic field and induce faster translational diffusion of water molecules moving along their longitudinal axis.<sup>4</sup> Here we extend this approach to describe the preparation,

physicochemical and toxicological characterization of magnetically and chemically active SWCNTs by inducing anisotropic water relaxation detectable by MRI.

In order to obtain sufficiently soluble and functionalized SWCNT preparations,<sup>5</sup> suitable for diagnostic or therapeutic applications,<sup>6</sup> both nanotube length and chemical inertness of the surface need to be optimized. In particular, CNT preparations are known to contain significant amounts of paramagnetic metals<sup>7</sup> and amorphous carbon derived from their process of synthesis. These crude preparations must be purified to remove unwanted paramagnetic impurities and amorphous carbon, while preserving the highly organized SWCNT structure. Four major methods have been proposed for this purpose: acid oxidation, gas oxidation, filtration, and chromatography.<sup>8,9</sup> It is widely accepted that the content of nanotubes can be increased selectively by oxidation, since the etching rate of amorphous carbons is faster than that of nanotubes. Purification through acid treatment often provides a complementary method to oxidation. Acid treatment causes the ends and sidewalls of the oxidized nanotubes to become functionalized with carboxylic groups useful for further processing. However, the acid management may eventually cause extensive disruption of the CNT nanotubular structure<sup>10</sup> and defects in sidewalls,<sup>11–13</sup> hampering further utilization. Optimization of this process then becomes mandatory to preserve adequate nanotubular structure and properties and minimize its deleterious effects.

In this work, we report on an optimized nitric acid oxidation protocol<sup>14</sup> using as starting materials commercial single-walled carbon nanotubes (Aldrich, 40–60%, prepared by chemical vapour deposition, CVD), having initially diameters of 2–10 nm and lengths of 1–5  $\mu\text{m}$  contaminated with residual 17% Ni and 4% Y. We investigated systematically 24 and 48 h oxidation times. A suspension of SWCNTs (200 mg) in  $\text{HNO}_3$  (25 ml) was heated under reflux. The reaction mixture was cooled and diluted with deionized water (100 ml). The resulting suspension

<sup>a</sup>Department of Electromechanics and Materials, Universidad Europea de Madrid, C/Tajo, s/n. Villaviciosa de Odón, Madrid-28670, Spain. E-mail: [arisbel.cerpa@uem.es](mailto:arisbel.cerpa@uem.es); Fax: +34 916168265; Tel: +34 912115658

<sup>b</sup>IMM, Institute of Microelectronics of Madrid, CNM, CSIC, Madrid-28760, Spain. E-mail: [mariana.koeber@imm.cnm.csic.es](mailto:mariana.koeber@imm.cnm.csic.es); Fax: +34 948060701; Tel: +34 918060700

<sup>c</sup>Institute of Biomedical Research "Alberto Sols", CSIC, Madrid-28029, Spain. E-mail: [scerdan@iib.uam.es](mailto:scerdan@iib.uam.es); Fax: +34 915854587; Tel: +34 915854444

<sup>d</sup>Laboratory of Organic Synthesis and MRI, Faculty of Sciences, UNED, Associated Unit CSIC, Madrid-28040, Spain. E-mail: [pballesteros@ccia.uned.es](mailto:pballesteros@ccia.uned.es); Fax: +34 913986697; Tel: +34 913987117

<sup>e</sup>Department of Experimental Physico-Chemical Sciences, Faculty of Sciences, UNED, Madrid-28040, Spain. E-mail: [ahernanz@ccia.uned.es](mailto:ahernanz@ccia.uned.es); Fax: +34 913986697; Tel: +34 913987377

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3md20235f

# Environmentally Sensitive Paramagnetic and Diamagnetic Contrast Agents for Nuclear Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy

Jesús Pacheco-Torres<sup>1</sup>, Daniel Calle<sup>1</sup>, Blanca Lizarbe<sup>1</sup>, Viviana Negri<sup>2</sup>, Carmen Ubide<sup>2</sup>, Rosa Fayos<sup>1</sup>, Pilar López Larrubia<sup>1</sup>, Paloma Ballesteros<sup>2</sup> and Sebastian Cerdan<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Imagen y Espectroscopia por Resonancia Magnética (LIERM), Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM, c/ Arturo Duperier 4, Madrid 28029, Spain. <sup>2</sup>Laboratorio de Síntesis Orgánica e Imagen Molecular por Resonancia Magnética (SOIRM), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, c/ Senda del Rey 9, Madrid 28040, Spain

**Abstract:** Even though alterations in the microenvironmental properties of tissues underlie the development of the most prevalent and morbid pathologies, they are not directly observable *in vivo* by Magnetic Resonance Imaging (MRI) or Spectroscopy (MRS) methods. This circumstance has led to the development of a wide variety of exogenous paramagnetic and diamagnetic MRI and MRS probes able to inform non invasively on microenvironmental variables such as pH, pO<sub>2</sub>, ion concentration or even temperature. This review covers the fundamentals of environmental contrast and the current arsenal of endogenous and exogenous MRI and MRS contrast enhancing agents available to visualize it. We begin describing the physicochemical background necessary to understand paramagnetic and diamagnetic contrast enhancement with a special reference to novel magnetization transfer and <sup>13</sup>C hyperpolarization strategies. We describe then the main macrocyclic structures used to support the environmentally sensitive paramagnetic sensors, including CEST and PARACEST pH sensitive probes, temperature probes and enzyme activity or gene expression activatable probes. Finally we address the most commonly used diamagnetic contrast agents including imidazolic derivatives to reveal extracellular pH and tissue pO<sub>2</sub> values by MRS. The potential applications of these agents in multimodal and molecular imaging approaches are discussed.

**Keywords:** Magnetic Resonance Imaging, Magnetic Resonance Spectroscopy, Tissue Microenvironment, Contrast Mechanisms, Paramagnetic Contrast Agents, Diamagnetic Contrast Agents, <sup>13</sup>C Hyperpolarized molecules, Molecular Imaging.

## 1. INTRODUCTION

The extracellular space of tissues is located between the cellular architectures and the capillary network providing a vital environment for intercellular communication and regulatory metabolic interactions (Fig. 1). The biochemical profile of this compartment modulates many vital intracellular functions including differentiation [1], tissue regeneration [2], angiogenesis [3], metastasis [4], proliferation [5] and apoptosis [6] or necrosis [7], among others. The extracellular “milieu” is characterized by a collection of environmental properties, such as pH, pO<sub>2</sub>, ionic composition or diffusion, which are significantly different from those of the intracellular or vascular spaces, configuring in this way a physiologically distinct compartment. Alterations in the environmental properties are known to occur very early during disease development, providing precious information for the diagnosis, prognosis and therapy assessment of the most prevalent and morbid pathologies in developed countries, with particular emphasis in cancer and ischemic episodes [8-10]. On these grounds, non invasive imaging of the extracellular microenvironment has gained substantial scientific and clinical interest in the last decades [11-13]. The biochemical properties of this compartment result from the balance between the cellular uptake and metabolism of substrates as glucose and

oxygen from the capillaries, and the removal of waste products as lactate and H<sup>+</sup> through the tissue microvasculature (Fig. 1A). Intracellular oxidative metabolism leads simultaneously to the production of freely diffusing CO<sub>2</sub> and water (in fast equilibrium with HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and H<sup>+</sup> through carbonic anhydrase). Reductions in glucose or oxygen delivery either by systemic limitations or inadequate performance of the local capillary network, result in extracellular lactate and proton accumulation, two conditions commonly found during the early development of most pathologies (Fig. 1B). Environmentally sensitive contrast agents (CA's) are molecules designed to respond to physiopathological alterations in the values of extracellular pH, pO<sub>2</sub>, lactate, glucose, ions as Ca<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup>, red-ox state or even temperature, in a manner detectable by MRI or MRS methods [14-17]. A variety of paramagnetic and diamagnetic “smart CAs” have been designed for this purpose. This review provides an integrative overview on the development and properties of these molecules.

The first generation of CA's included highly stable paramagnetic lanthanide chelates with linear or macrocyclic ligands derived from diethylenetriaminepentaacetic acid or tetraazamacrocyclic structures. These complexes, despite proving considerable capacity to reduce the relaxation times of tissue water *in vivo*, remained non specific hampering to obtain the desired microenvironmental information from the observed contrast enhancement. Improvements in the understanding of the structural and dynamic determinants of water relaxation in the presence of paramagnetic chelates, allowed

Address correspondence to this author at the Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC/UAM. c/ Arturo Duperier 4, Madrid 28029, Spain; Tel: 00-34- 91-585-4444; Fax: 00-34-91-585-4401; E-mail: scerdan@iib.uam.es

# Nanotubular Paramagnetic Probes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging Based on the Diffusion Tensor\*\*

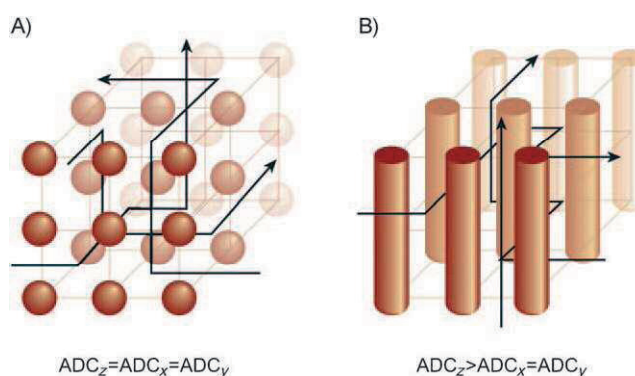
Viviana Negri, Arisbel Cerpa, Pilar López-Larrubia, Laura Nieto-Charques, Sebastián Cerdán, and Paloma Ballesteros\*

In memory of Mildred Cohn

Magnetic resonance imaging (MRI) is one of the most powerful imaging methods in modern clinical diagnosis. Its efficacy depends often not only on the correct implementation of the most appropriate imaging sequence, but on the use of suitable contrast agents.<sup>[1,2]</sup> These are exogenous molecules able to increase the quality, resolution, and specificity of MR image contrast, revealing structural and functional properties of tissues additional to those inherently present in the precontrast image. Classically, image contrast is enhanced by reducing the  $T_1$  and  $T_2$  relaxation rates of  $H_2O$  in tissue through the administration of  $Gd^{III}$  complexes having diethylenetriaminopentaacetic acid (DTPA) or 1,4,7,10-tetraaza-1,4,7,10-cyclododecanetetraacetic acid (DOTA) ligands. By using these agents it is possible to image noninvasively the anatomical location and perfusion properties of a variety of lesions including those arising from tumoral, ischemic, and neurodegenerative diseases. Further developments include activatable probes and targeting agents such as spherical nanoparticles.<sup>[3]</sup> More recently, the noninvasive imaging of the apparent translational diffusion coefficient (ADC) of water molecules in tissues by magnetic resonance methods has been shown to provide comprehensive information on tissue microstructure and its pathological alterations.<sup>[4]</sup> The methodology can be used to determine the ADC of water molecules along any direction in space; it is very sensitive to physiological variables as cellularity and edema as well as the anisotropic movement of water through the axonal tracts in white brain matter.<sup>[4,5]</sup> An important potential exists, therefore, to improve and increase this information through the use

of appropriate contrast agents. However, no such molecules are currently available.

Herein we report for that exogenous nanostructured materials are able to induce selectively the anisotropic diffusion of water molecules in the surrounding medium in a manner detectable by MRI methods. According to the Stokes–Einstein relationship, the translational diffusion of water will be faster in the direction having smaller molecular obstructions.<sup>[6]</sup> In an isotropic medium such as liquid water, or in a homogenous suspension of spherical nanoparticles (Figure 1A), the ADC measured along any direction in



**Figure 1.** The ADC of water is isotropic in aqueous solutions of a spherical contrast agent (A). However, in suspensions of magnetically aligned, paramagnetic SWNTs (B), the ADC of water is greater in the direction of the alignment than in the transversal plane.

space will be the same because the obstructions along the diffusion path are identical ( $ADC_x = ADC_y = ADC_z$ ). However, in a molecularly anisotropic medium, the random translation of water will be faster along those paths having smaller molecular obstructions (e.g.  $ADC_z > ADC_x = ADC_y$  in Figure 1B). This makes it possible to induce anisotropy in the diffusion of water molecules by using molecular probes of appropriate shape which serve as anisotropic obstructions. Single-walled carbon nanotubes (SWNTs) are ideal systems<sup>[7]</sup> for this purpose. Herein we demonstrate this principle by using paramagnetic SWNTs, which are prepared from commercially available sources by oxidation,<sup>[8]</sup> formulated as aqueous suspensions (in 2 % sodium benzenedodecylsulfonate, SBDS).

We began by determining the physicochemical properties of the SWNT suspensions employed. Firstly, high-resolution transmission electron microscopy (TEM) images (300 kV)

[\*] V. Negri, Dr. A. Cerpa,<sup>[†]</sup> Prof. P. Ballesteros  
Laboratorio de Síntesis Orgánica e Imagen Molecular por Resonancia Magnética, UNED  
Paseo Senda del Rey 9, 28040 Madrid (Spain)  
Fax: (+34) 91-398-6697  
E-mail: pballesteros@ccia.uned.es

Dr. P. López-Larrubia, L. Nieto-Charques, Prof. S. Cerdán  
Laboratorio de Imagen y Espectroscopía por Resonancia Magnética (LIERM), Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC)  
Arturo Duperier 4, 28029 Madrid (Spain)

[†] Present address: Universidad Europea de Madrid (Spain)

[\*\*] This work was supported in part by grants CTQ2006-06505/BQU, CTQ2009-14146-C01/C02, NAN2004-09125-C07-03, S-BIO/0179/2006, and SAF2008/01381, and by the EU (MEDITRANS Integrated Project NMP4-CT-2006-02668 to S.C., P.L.L., and P.B.). V.N. holds a JAE predoctoral fellowship from CSIC.





# Chemistry of paramagnetic and diamagnetic contrast agents for Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy pH responsive contrast agents

Elena Pérez-Mayoral<sup>a,b</sup>, Viviana Negri<sup>a</sup>, Jordi Soler-Padrós<sup>a</sup>,  
Sebastián Cerdán<sup>c</sup>, Paloma Ballesteros<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Síntesis Orgánica e Imagen Molecular por Resonancia Magnética, Facultad de Ciencias, UNED, Paseo Senda del Rey 9, E-28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Química Inorgánica y Química Técnica, Facultad de Ciencias, UNED, Paseo Senda del Rey 9, E-28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Laboratorio de Imagen Espectroscópica por Resonancia Magnética (LIERM), Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC/UAM, c/Arturo Duperier 4, E-28029 Madrid, Spain

Received 15 February 2008; accepted 27 February 2008

## Abstract

We provide a brief overview of the chemistry and most relevant properties of paramagnetic and diamagnetic contrast agents (CAs) for Magnetic Resonance Imaging and Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging. Paramagnetic CAs for MRI consist mainly of Gd(III) complexes from linear or macrocyclic polyaminopolycarboxylates. These agents reduce, the relaxation times  $T_1$  and  $T_2$  of the water protons in a concentration dependent manner, increasing selectively MRI contrast in those regions in which they accumulate. In most instances they provide anatomical information on performance. Because of its ability to discriminate easily between normal and diseased tissue, extracellular pH ( $pH_e$ ) has been added recently, to the battery of variables amenable to MRI investigation. A variety of Gd(III) containing macrocycles sensitive to pH, endogenous or exogenous polypeptides or even liposomes have been investigated for this purpose, using the pH dependence of their relaxivity or magnetization transfer rate constant (chemical exchange saturation transfer, CEST). Many environmental circumstances in addition to pH affect, however, relaxivity or limitations, our laboratory synthesized and developed a novel series of diamagnetic CAs for Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging, a new family of monomeric and dimeric imidazolic derivatives able to provide unambiguous measurements of  $pH_e$ , independent of water relaxivity, diffusion or exchange.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Magnetic Resonance Imaging; Magnetic Resonance Spectroscopy; Contrast agents; Paramagnetic chelates; Extracellular pH; pH probes

## 1. Introduction

Despite the fact that MR images were initially thought to provide enough endogenous contrast, the utilization of exogenous MRI contrast agents (CAs) has increased steadily to reach approximately 40–50% of the examinations currently performed. Reasons for this include the spectacular gain in resolution between normal and diseased tissues, their moderate cost and their adequate safety profile. This review will cover shortly the chemistry and properties of the paramagnetic CAs normally

used in clinical practice emphasizing the more recent development of “responsive CAs” useful to visualize the properties of the extracellular environment with special reference to extracellular pH ( $pH_e$ ). In addition we address in more detail the emerging field of diamagnetic CAs for Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging, analyzing the progress achieved since the first generation of diamagnetic CAs for spectroscopic imaging of  $pH_e$  was proposed by some of us.

## 2. Paramagnetic contrast agents for MRI

MRI CAs are pharmaceuticals reducing the longitudinal ( $T_1$ ) and transversal ( $T_2$ ) relaxation times of water in those tissue regions in which they accumulate [1,2]. The reduction in water

\* Corresponding author. Tel.: +34 913987320; fax: +34 913986697.

E-mail address: pballesteros@ccia.uned.es (P. Ballesteros).

Review

## Synthetic Approaches to Heterocyclic Ligands for Gd-Based MRI Contrast Agents

Elena Pérez-Mayoral <sup>1,2</sup>, Jordi Soler-Padrós <sup>1</sup>, Viviana Negri <sup>1</sup>, Sebastián Cerdán <sup>3</sup> and Paloma Ballesteros <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Síntesis Orgánica e Imagen Molecular por Resonancia Magnética, Facultad de Ciencias, UNED, Paseo Senda del Rey 9, E-28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Química Inorgánica y Química Técnica, Facultad de Ciencias, UNED, Paseo Senda del Rey 9, E-28040 Madrid, Spain

<sup>3</sup> Laboratorio de Imagen Espectroscópica por Resonancia Magnética (LIERM), Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC/UAM, C/ Arturo Duperier 4, E-28029 Madrid, Spain

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-mail: pballesteros@ccia.uned.es. Phone: (+34) 913987320. Fax: (+34) 913986697.

Received: 29 May 2007; in revised form: 3 August 2007/ Accepted: 3 August 2007 / Published: 9 August 2007

---

**Abstract:** Magnetic Resonance Imaging (MRI) methods are currently used in the clinic for the non invasive detection and characterization of a wide variety of pathologies. Increases in the diagnostic efficiency of MRI have been helped by both the design of dedicated MR sequences revealing specific aspects of the pathology and by the development of more sensitive and selective Contrast Agents (CAs), capable of more precisely delineating the borderline regions. In the present review we focus on the synthetic strategies used to obtain MRI CAs containing heterocyclic rings.

**Keywords:** Lanthanide Complexes, Contrast Agents, Heterocyclic Ligands, MR Imaging

---



## Anexo II: Patentes

---







Nº SOLICITUD:

P 2 0 1 4 0 0 0 5 8

FECHA Y HORA DE ENTRADA EN OEPM:

23-ENE-14 12:05

FECHA Y HORA DE ENTRADA EN LUGAR DISTINTO A LA OEPM:

LUGAR DE PRESENTACIÓN

CODIGO

## INSTANCIA DE SOLICITUD

### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA SOLICITUD

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICIÓN A LA PATENTE  
☐ SOLICITUD DIVISIONAL  
☐ CAMBIO DE MODALIDAD  
☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA  
☐ ENTRADA EN FASE NACIONAL DE SOLICITUD PCT

(3) EXPEDIENTE PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD:

Nº SOLICITUD:

FECHA PRESENTACIÓN:

### 2. TÍTULO DE LA INVENCION (4)

Compuestos y composiciones que comprenden nanotubos de carbono y compuestos de fórmula (I) y su uso como agentes de contraste

### 3. IDENTIFICACIÓN DEL SOLICITANTE

(5) APELLIDOS Y NOMBRE / DENOMINACIÓN SOCIAL

NIF/PASAPORTE

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA

Q2818016D

DIRECCIÓN POSTAL

CÓDIGO POSTAL Y  
LOCALIDAD

PROVINCIA

PAÍS  
RESIDENCIA

CODIGO PAÍS  
RESIDENCIA

C/ Bravo Murillo, 38

28015

Madrid

España

ES

PAÍS DE NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS  
NACIONALIDAD

CNAE (6)

PYME (7)

ESPAÑA

ES

DIRECCIÓN CORREO ELECTRÓNICO

Nº TELÉFONO FIJO

Nº TELÉFONO MÓVIL

(8) INDICACIÓN DEL MEDIO DE NOTIFICACIÓN PREFERENTE

clorido@pas.uned.es

913987437

☒ CORREO POSTAL

☐ CORREO ELECTRÓNICO

PORCENTAJE DE TITULARIDAD (9): 51 %

NOTA: DE NO ESPECIFICARSE DICHO PORCENTAJE, LA OEPM PRESUMIRÁ IGUALES LAS CUOTAS DE LOS SOLICITANTES.

EL SOLICITANTE TAMBIÉN (10) ☐ SI  
ES INVENTOR:

☒ NO

MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: (11)

☒ INVENCION LABORAL ☐ CONTRATO ☐ SUCESIÓN

☐ OTROS (Especificar):

(12) EL SOLICITANTE ES UNA UNIVERSIDAD PÚBLICA ESPAÑOLA

☒ SI

### 4. OTROS SOLICITANTES Y/O INVENTORES (13)

☒ LOS DEMAS SOLICITANTES Y/O INVENTORES SE INDICAN EN HOJA COMPLEMENTARIA

## 5. IDENTIFICACIÓN DEL REPRESENTANTE

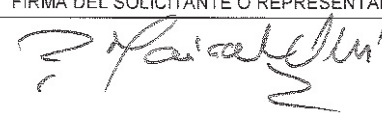

(14) REPRESENTACIÓN		(15) N° PODER GENERAL
<input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ESTÁ REPRESENTADO	EL SOLICITANTE ESTÁ REPRESENTADO POR: <input type="checkbox"/> AGENTE DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL <input type="checkbox"/> OTRO REPRESENTANTE	
(16) ACTUACIÓN POR MEDIO DE AGENTE	NOMBRE	CÓDIGO DE AGENTE

(17) ACTUACIÓN POR MEDIO DE OTRO REPRESENTANTE	NOMBRE	DIRECCIÓN POSTAL	N.I.F.
DIRECCIÓN CORREO ELECTRÓNICO	N° TELÉFONO	(18) INDICACIÓN DEL MEDIO DE NOTIFICACIÓN PREFERENTE	
		<input type="checkbox"/> CORREO POSTAL <input type="checkbox"/> CORREO ELECTRÓNICO	

## 6. OTROS DATOS

(19) REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD	PAIS ORIGEN	CODIGO PAÍS	FECHA	NÚMERO
<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO				
(20) EXPOSICIONES OFICIALES	NOMBRE		FECHA	LUGAR
<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO				
(21) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO	AUTORIDAD DE DEPÓSITO	CODIGO PAÍS	FECHA	NÚMERO
<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO				
LISTAS DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS				
La descripción contiene un listado de secuencias biológicas en concordancia con la norma ST.25 OMPI <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
Se adjunta un soporte de datos legible por ordenador que incluye el listado de secuencias biológicas en concordancia con la norma ST.25 OMPI <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
El solicitante declara por medio de esta instancia, que la información registrada en el soporte de datos legible por ordenador es idéntica a la contenida en el listado de secuencias biológicas incluido en la descripción de la versión escrita de esta solicitud <input type="checkbox"/>				
(22) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES				<input type="checkbox"/> SI

## 7. ÍNDICE DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN / FECHA Y FIRMA (23)

<input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCIÓN. N° PÁGINAS: 33 <input checked="" type="checkbox"/> N° DE REIVINDICACIONES: 6 <input type="checkbox"/> DIBUJOS. N° PÁGINAS: 6 <input type="checkbox"/> LISTA DE SECUENCIAS. N° PÁGINAS: <input type="checkbox"/> SOPORTE LEGIBLE POR ORDENADOR DE LISTA DE SECUENCIAS <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> FIGURA A PUBLICAR EN BOPÍ N°: <u>1</u> <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD	<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD <input checked="" type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA <input type="checkbox"/> PRUEBAS DE LOS DIBUJOS <input type="checkbox"/> SOLICITUD CAP <input type="checkbox"/> OTROS:	FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE  Ricardo Mairal Usón - Vicerector de Investigación - UNED FIRMA DEL FUNCIONARIO 
--	--	--

Ejemplar para el solicitante

ADVERTENCIA: POR DISPOSICIÓN LEGAL LOS DATOS CONTENIDOS EN ESTA SOLICITUD PODRÁN SER PUBLICADOS EN EL BOLETÍN OFICIAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL E INSCRITOS EN EL REGISTRO DE PATENTES DE LA OEPM, SIENDO AMBAS BASES DE DATOS DE CARÁCTER PÚBLICO Y ACCESIBLES VÍA REDES MUNDIALES DE INFORMÁTICA



Nº SOLICITUD:

P 2 0 1 4 0 0 0 5 2

FECHA Y HORA DE ENTRADA EN OEPM:

FECHA Y HORA DE ENTRADA EN LUGAR DISTINTO A LA OEPM:

## HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA SOLICITUD

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

### 2. IDENTIFICACIÓN DE LOS SOLICITANTES (2)

(3) APELLIDOS Y NOMBRE / DENOMINACIÓN SOCIAL / INFORMACIÓN RELATIVA A UNIVERSIDAD PÚBLICA ESPAÑOLA	PAÍS NAC.	CÓD. NAC.	NIF/ PASAPORTE	(4) ESTA PERSONA TAMBIÉN ES INVENTOR:	(5) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input type="checkbox"/> SI	Espa	ES	Q2818002D	<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO	<input checked="" type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESIÓN <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: 24,5%
Universidad Autónoma de Madrid  ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input checked="" type="checkbox"/> SI	Espa	ES	Q2818013A	<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESIÓN <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: 24,5%
  ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input type="checkbox"/> SI				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESIÓN <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: %
  ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input type="checkbox"/> SI				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESIÓN <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: %
  ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input type="checkbox"/> SI				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESIÓN <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: %

**NOTA: DE NO ESPECIFICARSE EL PORCENTAJE DE TITULARIDAD, LA OEPM PRESUMIRÁ IGUALES LAS CUOTAS DE LOS SOLICITANTES.**

### 3. IDENTIFICACIÓN DE LOS INVENTORES (Incluir sólo aquellos inventores que no figuren como solicitantes) (6)

APELLIDOS Y NOMBRE	PAÍS NACIONALIDAD	CODIGO NAC.	NIF/PASAPORTE
Ballesteros García, Paloma	España	ES	50794221D
Negri, Viviana	Italia	IT	X8111486F
Calle Hernández, Daniel	España	ES	70869746F

Ejemplar para el solicitante

8.114.1870

4. OTROS DATOS

(7) EXPOSICIONES OFICIALES			
NOMBRE		FECHA	LUGAR
(8) REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD			
PAÍS ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	FECHA	NUMERO

Ejemplar para el solicitante



- 21 N.º solicitud: 201400058  
22 Fecha de presentación de la solicitud: 23.01.2014  
32 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	M. F. FERREIRA et al., "Ln[DO3A-N- $\alpha$ -(pyrenebutanamido) propionate] complexes: Optimized relaxivity and NIR optical properties", Dalton Transactions, 2014 (accesible en línea 17.12.2013), vol. 43, páginas 3162-3173, ver Fig. 1.	1-6
A	WO 2006051142 A1 (UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA) 18.05.2006, reivindicaciones.	1-6
A	US 20130231475 A1 (T-J. KIM et al.) 05.09.2013, figura 1.	1-6
A	P. K. AVTI et al., "Toward single-walled carbon nanotube-gadolinium complex as advanced MRI contrast agents: Pharmacodynamics and global genomic response in small animals", Journal of Biomedical Materials Research Part B, 2013, vol. 101B, páginas 1039-1049.	1-6
A	US 20130079503 A1 (H. Y LEE et al.) 28.03.2013, figura 1.	1-6

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
15.09.2014

Examinador  
E. Dávila Muro

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07F5/00** (2006.01)**C07D257/02** (2006.01)**C07C15/38** (2006.01)**B82Y5/00** (2011.01)**A61K49/06** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07F, C07D, C07C, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NLP, REGISTRY, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.09.2014

**Declaración****Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**Reivindicaciones 1-6  
Reivindicaciones**SI**  
**NO****Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**Reivindicaciones 1-6  
Reivindicaciones**SI**  
**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.



**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	M. F. FERREIRA et al., Dalton Transactions, 2014, vol. 43, pgs. 3162-3173.	2013
D02	WO 2006051142 A1	18.05.2006
D03	US 20130231475 A1	05.09.2013
D04	P. K. AVTI et al., Journal of Biomedical Materials Research Part B, 2013, vol. 101B, pgs. 1039-1049.	2013
D05	US 20130079503 A1	28.03.2013

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención se refiere a compuestos que comprenden nanotubos de carbono y complejos de gadolinio de fórmula general I. La invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos y a su uso como agentes de contraste en imagen por resonancia magnética nuclear.

El documento D01 se considera el estado de la técnica más próximo a la invención y divulga unos complejos de lantánido  $\text{Ln}^{3+}$  ( $\text{Ln}=\text{Gd}$ ,  $\text{Yb}$ ,  $\text{Nd}$ ) con un agente quelante DO3A-N- $\alpha$ -(amino)propionato y amido conjugados que tienen aplicación como agentes de contraste en imágenes de resonancia magnética nuclear. En particular se divulga el complejo de  $\text{Gd}^{3+}$  con el ligando macrocíclico DO3A-N- $\alpha$ -(pirenobutanamido)propionato (ver Esquema 1), que es un derivado del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-teraacético (DOTA) que cuenta con un resto (butanamido)propionato unido a un sistema de pireno. La diferencia entre lo divulgado en D01 y el objeto de la invención radica en que en D01 no se hace referencia a la formación de un aducto  $\pi-\pi$  entre los complejos de  $\text{Gd}^{3+}$  y los nanotubos de carbono.

El documento D02 divulga unos complejos de gadolinio como agentes de contraste para el diagnóstico clínico por imagen de resonancia magnética nuclear. Son complejos de  $\text{Gd}^{3+}$  y un ligando DOTA sustituido con un resto 1-pirazoliletilo (ver reivindicaciones 1-8).

El documento D03 divulga también unos complejos de  $\text{Gd}^{3+}$  que tienen un ligando derivado de ácido DO3A-tranexámico o su éster derivado (ver Fig. 1) y que tienen aplicación como agentes de contraste para el diagnóstico por imagen de resonancia magnética nuclear.

El documento D04 se refiere a la preparación de complejos de nanopartículas de Gd con nanotubos de carbono monocapa (Gd-SWCNTs) que tienen aplicación como agentes de contraste para imagen por resonancia magnética nuclear. Se preparan mediante la técnica de deposición química en fase vapor en presencia de un copolímero anfifílico de tipo PEG-DSPE, de forma que las nanopartículas de Gd catalizan el crecimiento de los nanotubos de carbono y quedan incluidas y localizadas en uno de los extremos de los nanotubos (ver pág. 1040).

El documento D05 divulga complejos de tipo GO-Gd-DPTA constituidos por iones  $\text{Gd}^{3+}$  con ligandos quelantes de ácido dietilentiaramina pentaacético (Gd-DPTA) unidos covalentemente a óxido de grafeno (GO). También se menciona en este caso su aplicación como agentes de contraste en resonancia magnética nuclear.

No se han encontrado en el estado de la técnica documentos que hagan referencia a complejos de Gd con ligandos quelantes de tipo DOTA monoamida que tengan un sustituyente pireno que se correspondan con la fórmula general I y que además formen aductos de tipo  $\pi-\pi$  con nanotubos de carbono. Tampoco existen indicios que lleven al experto en la materia a concebir el uso de los complejos de Gd de fórmula I con nanotubos de carbono como agentes de contraste en imagen por resonancia magnética nuclear.

En consecuencia, las características de las reivindicaciones 1-6 se consideran nuevas y con actividad inventiva y aplicación industrial según los artículos 6.1 y 8.1 LP 11/1986.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
16 de Julio de 2009 (16.07.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2009/087253 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 49/18 (2006.01) G01R 33/563 (2006.01)

G01R 33/50 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2008/070247

(22) Fecha de presentación internacional:

30 de Diciembre de 2008 (30.12.2008)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P200800024 8 de Enero de 2008 (08.01.2008) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS** [ES/ES]; C/Serrano 117, 28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACION A DISTANCIA** [ES/ES]; C/Bravo Murillo 38, 4º, 28015 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **CERDAN GARCIA-ESTELLER, Sebastian** [ES/ES]; INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS ALBERTO SOLS (IIB), C/ Arturo Duperier, 4, 28029 Madrid (ES). **LOPEZ LARRUBIA, Pilar** [ES/ES]; INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS ALBERTO SOLS (IIB), C/ Arturo Duperier, 4, 28029 Madrid (ES). **NIETO**

**CHARQUES, Laura** [ES/ES]; INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS ALBERTO SOLS (IIB), C/ Arturo Duperier, 4, 28029 Madrid (ES). **BALLESTEROS GARCIA, Paloma** [ES/ES]; C/Bravo Murillo 38, 4º, 28015 Madrid (ES). **PEREZ MAYORAL, Elena** [ES/ES]; C/Bravo Murillo 38, 4º, 28015 Madrid (ES). **NEGRI, Viviana** [IT/ES]; UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACION A DISTANCIA, C/Bravo Murillo 38, 4º, 28015 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta Ruben Dario 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: TUBULAR NANOSTRUCTURED MATERIALS HAVING ANISOTROPIC MAGNETIC PROPERTIES, METHOD FOR OBTAINING SAME AND USE THEREOF

(54) Título: MATERIALES NANOESTRUCTURADOS TUBULARES CON PROPIEDADES MAGNETICAS ANISOTROPICAS, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES

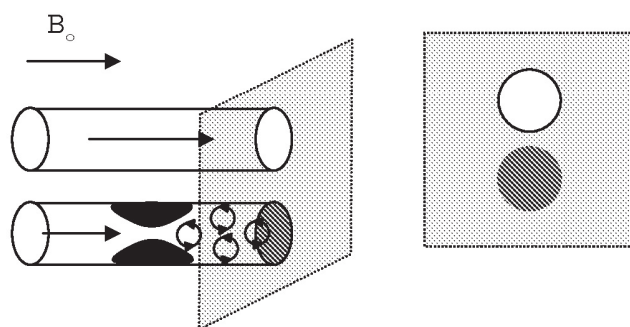


FIG 2

(57) Abstract: The invention relates to a contrast agent comprising a tubularly arranged nanostructured material soluble in aqueous solutions, having anisotropic properties and containing paramagnetic metals or superparamagnetic or ferromagnetic structures, which can be used in the production of an NMR diagnostic pharmaceutical composition for determining the laminar or turbulent flow and/or the rheological properties of fluids flowing through tubular pipes.

(57) Resumen: La presente invención lo constituye un agente de contraste, basado en un material nanoestructurado organizado de forma tubular, soluble en disoluciones acuosas, con propiedades anisotrópicas y con un contenido de metales pa-

ramagnéticos o estructuras superparamagnéticas o ferromagnéticas, que puede emplearse en la elaboración de una composición farmacéutica de diagnóstico de RMN para la determinación del flujo laminar o turbulento y/o las propiedades reológicas de fluidos que circulen en conducciones tubulares.

WO 2009/087253 A1



MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones*

**Publicada:**

— *con informe de búsqueda internacional*